

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE
COMPLEXOS DE MOLIBDÉNIO (II)

Miguel Mateus dos Santos Lopes

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE
COMPLEXOS DE MOLIBDÉNIO (II)**

Miguel Mateus dos Santos Lopes

Orientadora: Prof. Doutora Margarida Meireles

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, a **Dra. Margarida Meireles**, uma pessoa muito estudiosa, argumentativa, motivadora e divertida, que sempre me incitou ao longo deste ano a procurar fazer mais e melhor pelo conhecimento científico. Muito obrigado por me ter possibilitado fazer este estágio tão interessante e no qual aprendi imenso e redescobri o prazer de trabalhar num laboratório de um modo direccionado, eficiente e sempre em ritmo vivo.

Agradeço à **Dra. Maria José Calhorda**, um pessoa muito ponderada, sábia e sempre disponível a auxiliar os outros. Muito obrigado por me ter proporcionado a viagem a Zaragoza onde vi outros trabalhos serem desenvolvidos em prol da nossa área e conheci pessoas fantásticas, e por me ter guiado tanto no meu trabalho com o seu vasto conhecimento ao longo deste meu estágio.

Agradeço a todo o restante **Grupo de Química Inorgânica Teórica** que me soube apontar os meus erros e auxiliar-me nos mais variados momentos do meu trabalho. Muito obrigado por me fazerem sentir parte do grupo e por me ajudarem neste meu estágio, sobretudo a nível da síntese dos compostos e nas minhas apresentações orais.

Agradeço a toda a minha **Família** que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis deste ano (e não só) e que me levaram a ser o homem que sou hoje, com um futuro digno em vista. Muito obrigado por tudo Pai, Mãe, Bruno, Filipe, Mariana e Pedro; devo-vos muito, só espero poder retribuir por tudo o que fizeram por mim.

Agradeço a todos os meus **amigos da Faculdade de Ciências**, por todas as boas e más experiências que me fizeram passar durante estes últimos cinco anos que estive na instituição. Tudo o que passei com vocês tornou-me uma pessoa mais adulta e mais responsável, sendo que apenas lamento algumas escolhas menos felizes que fiz

inicialmente e que tenho a certeza absoluta que me prejudicaram a nível académico. Obrigado por não desistirem de mim e continuarem a apoiar-me nas fases mais críticas.

Agradeço aos meus grandes amigos de Secundário: **Joana, David, Diana, Igor, Ana Isabel, Ding, Liliana e João**. Refiro estes pois são os membros do eterno grupo que de tempos a tempos tem o belo do encontro para tomar um café, pôr a conversa em dia, contar as novidades da vida de cada um, mantendo assim uma grande amizade. Obrigado por se manterem sempre em contacto e por preservarem este óptimo grupo.

Agradeço à **Comunidade PCM-Portugal**, por me terem acolhido e me terem feito crescer enquanto pessoa e enquanto membro colaborador para todos vocês.

Agradeço a duas pessoas muito especiais para mim: **Raquel e Xana**. Cada qual, á sua maneira, fez de mim uma pessoa mais feliz, capaz de ver o mundo com outros olhos e acreditar que o futuro ideal existe, cada qual só tem de procurar e lutar por ele. A vocês, minhas amigas, desejo a maior sorte do mundo no vosso futuro.

Deixei para o fim a única pessoa a quem eu tinha de escrever mesmo à parte. Já lá vão 13 anos a caminhar na vida a teu lado, e no entanto sinto que mal te conheço. Continuo a cometer asneiras dia-a-dia e lá continuas tu a apontar-me os erros e a tentar melhorar-me. Continuo a fazer escolhas erradas e sempre contigo a endireitar-me no caminho seja ele pessoal ou profissional. Continuo a não ter ritmo para te acompanhar, mas tu continuas a incentivar-me a dar tudo para ir mais longe. Infelizmente tudo isso mudará em Janeiro, com a tua ida para o Norte e depois para a Escócia. Já não estarás sempre aqui para me corrigir ou endireitar ou incentivar, terei de finalmente mostrar que sei voar sozinho em vez de apanhar a tua onda e ver como me saio. Sei que não irás embora de vez, mas o facto de finalmente chegarmos a uma estrada com divisória, mesmo com as suas aberturas esporádicas, terá as suas consequências. Obrigado por me teres feito crescer como pessoa e como pensador. Por tudo isto, obrigado **Daniel**.

RESUMO

Estudo da Actividade Antitumoral de Complexos de Molibdénio(II)

O cancro, uma das maiores causas de morte no Mundo, é sem dúvida a doença para cuja cura mais esforços têm sido mobilizados. O meu trabalho insere-se nesse objectivo. Foram realizados vários ensaios para avaliar do ponto de vista bioquímico a possível acção de dois compostos de molibdénio(II), **T1** e **B2**, pertencentes a uma família de complexos previamente testada, que contêm dois ligandos diferentes, um neutro (**L1** ou **L2**) e um aniónico (brometo ou triflato).

Efectuaram-se testes para avaliar a actividade citotóxica dos compostos em três linhas celulares distintas, HeLa (cancro do cólo do útero), MCF-7 (cancro da mama) e RPE (epitélio da retina, única linha não-tumoral), a sua cinética de acção e quantificar o molibdénio intracelular. Os compostos demonstraram possuir um efeito antiproliferativo poderoso, com IC₅₀ entre 1 e 23 µM. A quantificação do molibdénio intracelular revelou uma dependência directa da quantidade de molibdénio intracelular com a concentração de composto incubado com as células.

Estudos de estabilidade dos complexos em solução, da sua condutividade eléctrica e do coeficiente de partição octanol-água mostraram que os compostos eram estáveis em solução aquosa, e tinham baixa (**B2**) ou nenhuma (**T1**) condutividade e carácter hidrofóbico (coeficientes de partição positivos).

A incubação de DNA plasmídico com os compostos sugeriu a alteração do seu padrão de migração em gel de agarose, pois a migração das bandas do DNA plasmídico foi retardada de forma dependente da sua concentração. Experiências de titulação de DNA com os compostos revelaram hipocromismo e batocromismo nos espectros após a titulação com DNA, parecendo haver interacção com o DNA através de intercalação.

Estes resultados demonstram que estes compostos são promissores e que mais estudos devem ser feitos no sentido de compreender o seu mecanismo de acção.

ABSTRACT

Study of the antitumoral activity of molybdenum(II) complexes

Cancer is responsible for one of the largest death causes worldwide and has been the object of more efforts towards its cure than many others. Still the available chemotherapy treatment is not in general sufficiently effective. This work aims at contributing to solve this issue, by evaluating from a biochemical point of view two different molybdenum(II) compounds, **T1** and **B2**, belonging to a previously tested family of molybdenum complexes, which differ by two ligands, a neutral one (**L1** or **L2**) and an anionic one (bromide or triflate).

Tests to evaluate the cytotoxic activity of these compounds were performed against three cell lines, HeLa (cervical cancer), MCF-7 (breast cancer) and RPE (retinal epithelium, only non-tumoral cell line), and both their kinetic of action and the intracellular molybdenum were investigated. These studies revealed a powerful cytotoxic effect against all cell lines, with IC_{50} ranging from 1 to 23 μ M. The cytotoxicity of **T1** always changed with incubation time, but stayed almost constant with **B2**. The intracellular molybdenum depended on the concentration of the complex incubated with cells in both cases.

Other studies addressed the stability of the complexes in aqueous solution and the octanol/water partition coefficient. The two compounds were very slowly oxidized in solution, according to mass spectroscopy results, and exhibited hydrophobic properties (positive partition coefficients). Plasmid DNA incubated with complexes was evaluated, and showed that the complexes retarded plasmid DNA migration in electrophoresis gels in a concentration dependent way. DNA titrations with varying amounts of complexes were also carried out. The electronic spectra of both complexes showed hypochromism and bathochromism of the maximum absorption band in DNA titrations, suggesting that intercalation in DNA could be taking place.

These compounds seem thus promising and further study is required in order to understand fully the mechanisms leading to their cytotoxicity.

ÍNDICE

<u>AGRADECIMENTOS</u>	1
<u>RESUMO</u>	3
<u>ABSTRACT</u>	3
<u>ÍNDICE</u>	5
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	7
<u>ÍNDICE DE TABELAS</u>	9
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	10
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	12
1.1 O Cancro	12
1.2 A Quimioterapia	13
1.3 Limitações e resistência à quimioterapia	16
1.4 Química Medicinal	18
1.5 Compostos de molibdénio	19
1.6 Mecanismos de acção de compostos metálicos anticancerígenos	20
1.7 Abordagens experimentais utilizadas	22
2. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	23
2.1 Compostos de Molibdénio	23
2.2 Linhas celulares	23
2.3 Equipamento e cuidados laboratoriais	24
2.3 Meio de cultura e soluções usadas em passagens celulares	25
2.4 Tripsinização e passagem celular	26
2.5 Contagem de células	27
2.6 Crio-preservação e descongelamento	27
2.7 Preparação de soluções	28
2.8 Ensaios de citotoxicidade/cinética de incubação	29
2.9 Quantificação de molibdénio intracelular	32
2.10 Estabilidade dos compostos em solução	32
2.11 Condutividade	33

2.12	Determinação do coeficiente de partição octanol/água	34
2.13	Extracção e análise de DNA plasmídico por electroforese	35
2.14	Titulação de DNA por Absorção	36
3.	<u>TRATAMENTO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS</u>	38
3.1	Ensaio de citotoxicidade/cinética de incubação	38
3.2	Quantificação de molibdénio intracelular	42
3.3	Estabilidade dos compostos em solução	44
3.4	Condutividade	47
3.5	Determinação do coeficiente de partição octanol/água	48
3.6	Extracção e análise de DNA plasmídico por electroforese	50
3.7	Titulação de DNA por Absorção	52
4.	<u>CONCLUSÕES</u>	57
5.	<u>PERSPECTIVAS FUTURAS</u>	60
6.	<u>REFERÊNCIAS</u>	61
7.	<u>ANEXOS</u>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, três dos principais agentes quimioterapêuticos utilizados (Adaptado de [10]).....	14
Figura 2 – Diferentes mecanismos de resistência e respectivas curvas dose-resposta (Adaptado de [18]).....	17
Figura 3 – Estruturas dos vários complexos utilizados nos estudos: precursor; composto T1; composto B2; ligando L1; ligando L2.	23
Figura 4 – Esquema representativo da aplicação das soluções de compostos e respectivos controlos numa microplaca de 96 poços.	30
Figura 5 – Da esquerda para a direita, compostos T1, B2, B1 e T2 (os dois últimos retirados de [26]).	38
Figura 6 – Gráficos de viabilidade celular em células HeLa para os estudos citotóxicos efectuados com os diferentes compostos.....	39
Figura 7 – Gráfico dos valores de IC ₅₀ obtidos para os dois compostos nas várias linhas celulares testadas.	40
Figura 8 – Gráfico comparativo dos valores de IC ₅₀ e respectivos erros-padrão dos compostos T1 e B2 após diferentes tempos de incubação na linha celular HeLa.	41
Figura 9 – Quantificação de molibdénio intracelular em células HeLa incubadas com diferentes concentrações dos complexos B2 e T1.	43
Figura 10 - Variação do espectro de absorção do complexo T1, em solução aquosa com 0,5% de DMSO, com o tempo de incubação da solução.	44
Figura 11 - Variação do espectro de absorção do complexo B2, em solução aquosa com 0,5% de DMSO, com o tempo de incubação da solução.	45
Figura 12 – Espectro de massa do composto B2 sem incubação prévia.....	45
Figura 13 – Espectro de massa do composto T1 sem incubação prévia.....	46
Figura 14 - Condutividade de soluções aquosas dos compostos T1 e B2 (* <i>p</i> < 0.05).	47
Figura 15 - Coeficientes de partição octanol-água dos compostos B2 e T1.....	49

Figura 16 - Gel de agarose (1 % m/V) com amostras do plasmídeo pYES2 incubado com diferentes concentrações do composto T1 (10, 50 e 100 mM); M corresponde aos marcadores.	51
Figura 17 - Gel de agarose (1 % m/V) com amostras do plasmídeo pYES2 incubado com diferentes concentrações do composto B2 (10, 50 e 100 mM); M corresponde aos marcadores.	51
Figura 18 – Variação da absorvência do composto B2, indicado de acordo com a seta, a 299 nm (pico máximo de absorção) com o aumento da concentração de DNA no ensaio.	53
Figura 19 – Variação do espectro do composto T1, indicado de acordo com a seta, a 272 nm (pico máximo de absorção) com o aumento da concentração de DNA no ensaio. ...	53
Figura 20 – Recta obtida em função das medidas de absorvência no pico máximo de absorção de cada composto para várias concentrações de DNA.....	55
Figura 21 – Gráfico comparativo das constantes de ligação dos compostos B2, T1 e do BrEt. ^[42]	55
Figura 22 – Espectro de massa do composto B2 após 1 hora de incubação.....	65
Figura 23 – Espectro de massa do composto B2 após 2 horas de incubação.	65
Figura 24 – Espectro de massa do composto B2 após 24 horas de incubação.	66
Figura 25 – Espectro de massa do composto B2 após 48 horas de incubação.	66
Figura 26 – Espectro de massa do composto T1 após 1 hora de incubação.....	67
Figura 27 – Espectro de massa do composto T1 após 2 horas de incubação.	67
Figura 28 – Espectro de massa do composto T1 após 24 horas de incubação.	68
Figura 29 – Espectro de massa do composto T1 após 48 horas de incubação.	68
Figura 30 – Gráficos de viabilidade celular em células MCF-7 e RPE para estudos citotóxicos efectuados em células HeLa com diferentes compostos.	69
Figura 31 – Gráfico representativo da variação da absorvência no pico máximo de cada composto (271 nm para T1, 299 nm para B2) com a concentração do respectivo composto para determinação do respectivo coeficiente de extinção molar (declive da recta resultante).	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Principais fármacos para diversos tipos de cancro (Adaptado de [05]).	15
Tabela 2 – Valores de IC ₅₀ (μM) obtidos nos ensaios de citotoxicidade para as diversas linhas celulares.....	40
Tabela 3 –IC ₅₀ (μM) dos compostos após diferentes tempos de incubação com células HeLa.	41
Tabela 4 - Quantificação celular das amostras e respectiva quantidade de molibdénio (μg).....	42
Tabela 5 - Coeficientes de partição octanol-água obtidos para os compostos T1 e B2...	49
Tabela 6 – Valores obtidos para constantes de ligação ao DNA para os compostos T1 e B2 e valor tabelado na literatura para o BrEt. ^[42]	55
Tabela 7 – Valores de IC ₅₀ (μM) obtidos nos ensaios de citotoxicidade para as diversas linhas celulares para os ligandos L1 e L2, os compostos B2 e T1, e para os compostos B1 e T2 (retirado de [26]).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ABVD** *Adriamycin, Bleomycin, Vinblastine & Dacarbazine* (tratamento quimioterapêutico para linfomas de Hodgkin que envolve a utilização de um conjunto de compostos específicos)
- **ALL** *Acute Lymphoblastic Leukaemia* (leucemia linfoblástica aguda)
- **AML** *Acute Myeloid Leukaemia* (leucemia mielóide aguda)
- **BrEt** Brometo de Etídio
- **c.d.o.** Comprimento de onda
- **CDR** Curva dose-resposta
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **DNA** *Desoxyribonucleotic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- **EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético
- **FBS** *Fetal calf serum* (soro fetal de bovino)
- **FDA** *Food and Drug Administration* (órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle da entrada no comércio de certos produtos, como alimentos e medicamentos)
- **HeLa** Linha celular derivada de cancro do colo do útero
- **IC₅₀** *Half maximal inhibitory concentration* (concentração que inibe metade do crescimento celular)
- **ICP-MS** *Inductively coupled plasma mass spectrometry* (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)
- **LB** *Lysogeny broth* (meio de cultura bacteriano)
- **MCF-7** Linha celular derivada do cancro mamário humano
- **MTT** brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difenilotetrazólio
- **MOPP** *Mustargen, Oncovin, Procarbazine & Prednisone* (tratamento quimioterapêutico para linfomas de Hodgkin que envolve a utilização de um conjunto de compostos específicos)

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÉNIO(II)

- **NADH** Dinucleótido de nicotinamida e adenina
- **NADPH** Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- **NCI** *National Cancer Institute* (Instituto Nacional de Cancro nos Estados Unidos)
- **PM** Polioxomolibdatos
- **RNA** *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
- **ROS** *Reactive Oxygen Species* (espécies reactivas de oxigénio)
- **RPE** Linha celular derivada do epitélio da retina do olho humano
- **RPMI** *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura celular)
- **TAE** Tampão de electroforese com Tris, acetato e EDTA
- **UV** Ultra-Violeta

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Cancro

Actualmente o cancro é considerado a segunda maior causa de morte no mundo, o que o torna num tópico prioritário na busca de progresso a nível de tratamento.^[01] A busca de uma cura para esta doença levou a que as organizações internacionais de saúde investissem mais dinheiro e esforços. Esses investimentos levaram a um aumento considerável no desenvolvimento de fármacos que permitiram uma maior e melhor compreensão da patologia e progressos a nível da quimioterapia, ainda que estes não se tenham revelado muito efectivos dada a continuidade no elevado número de vítimas.^[02] Contudo, foi possível identificar diversas características específicas do desenvolvimento tumoral tais como potencial replicativo ilimitado, angiogénese contínua, fuga aos mecanismos habituais de morte celular (apoptose), auto-suficiência ao nível de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais que contrariem esse mesmo crescimento, carácter invasivo para os diversos tecidos e a criação de metástases.^[03] Todos estes factores contribuíram para a existência de mais de 100 tipos distintos de cancro já identificados, com diversos subtipos de tumores encontrados nos mesmos órgãos específicos.^[04] Todo este conhecimento adquirido a nível molecular, genético e celular ao longo dos anos de investigação não veio a revelar-se útil na obtenção de uma cura eficiente para tão letal doença.^[05] Os principais avanços que têm sido conseguidos, como já foi referido, foram no campo da quimioterapia, que tem sido o tratamento de referência em pacientes que são diagnosticados com cancros primários avançados ou já com metástases detectadas no organismo.^[06]

1.2 A Quimioterapia

O uso consciente da quimioterapia remonta a 1942, quando Louis Goodman e Alfred Gilman utilizaram gás mostarda para tentar promover a regressão de um linfoma não Hodgkin e suas metástases em pacientes, tendo como base autópsias feitas em soldados que faleceram na 1ª Guerra Mundial por exposição a esse gás. Efectivamente verificaram que levava à regressão tumoral nos pacientes mas tal efeito apenas durou algumas semanas, ficando no entanto estabelecido o princípio de administração sistémica de fármacos para induzir regressão tumoral.^[07] A partir daí, vários outros agentes alquilantes foram utilizados com o objectivo de conseguir o mesmo efeito mas de uma forma mais prolongada e/ou eficiente.^[39] Mais tarde foram testados em linfomas de Hodgkin diferentes tratamentos através dos MOPP e dos ABVD mas, apesar do segundo conjunto parecer mais promissor, nenhum foi tão eficaz como desejado sobretudo devido à resistência adquirida pelo tumor.^[08] Após a 2ª Guerra Mundial, Sydney Farber estudou o efeito de compostos análogos do ácido fólico, a aminopterina e o metotrexato, em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (ALL) após verificar que o ácido fólico levava à proliferação das células específicas deste tipo de cancro.^[07] Deste modo conseguiu criar os primeiros fármacos a induzir regressão em pacientes com ALL, apesar deste efeito continuar a ser somente de breve duração. Este avanço foi significativo ao ponto do metotrexato ainda ser utilizado actualmente como agente quimioterapêutico. Todos estes estudos demonstraram também a capacidade das células cancerígenas criarem mecanismos de resistência aos fármacos administrados, passando a ser usados como modelo para compreensão desses mesmos mecanismos. Já na década de 60 foi igualmente descoberto que existiam alguns compostos de origem natural que inibiam a divisão celular, como a vincristina que é um alcalóide proveniente da planta *Vinca*.^[09] Na sequência destes estudos, compreendeu-se que era necessário proceder a um tipo de tratamento no qual se utiliza combinações de vários fármacos, cada qual com um diferente mecanismo de acção, de modo a evitar ao máximo que as células cancerosas desenvolvam resistência aos mesmos.^[07] Em 1965 veio a efectuar-se

uma descoberta que seria considerada das mais relevantes a nível da quimioterapia actual: a actividade da *cis*-diaminodicloroplatina(II) ou cisplatina. Foi Barnett Rosenberg, investigador na Universidade Estadual do Michigan, que verificou a sua formação em eléctrodos de platina quando estudava o efeito de corrente eléctrica em *Escherichia coli*, associando posteriormente a sua presença à inibição da divisão celular que ocorria.^[05] Mais tarde foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e começou a ser usada em tratamento para cancro testicular, sendo actualmente um dos três compostos de platina mais solidamente estabelecidos a nível de fármacos utilizados na maioria dos diferentes tratamentos em quimioterapia; outros compostos análogos da cisplatina são a carboplatina e a oxaliplatina (Figura 1).^[10]

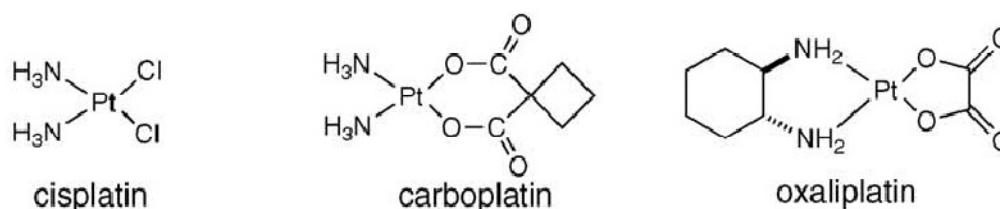


Figura 1 – Cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, três dos principais agentes quimioterapêuticos utilizados (Adaptado de [10]).

A justificação para a baixa quantidade de fármacos aceite pela FDA (29 em 280 entre 1975 e 1994, o que corresponde apenas a cerca de 10%), apesar dos muitos estudos efectuados e muito deles em casos bem sucedidos, deve-se sobretudo a três grandes factores: a elevada toxicidade dos agentes anticancerígenos, a baixa eficácia dos mesmos e a pouca ou nula relevância dada ao mecanismo de acção do mesmo aquando do planeamento do ensaio clínico.^[11] Durante esse período, o progresso verificado na quimioterapia decresceu, com os fármacos mais promissores a terem de ser submetidos a variados testes clínicos e a obterem apenas consequências infimamente positivas contra cancros sólidos. Perante esta aparente estagnação do desenvolvimento de agentes anticancerígenos, no princípio da década de 80, o Instituto Nacional de Cancro (NCI, Estados Unidos) adoptou uma nova estratégia de ensaios clínico, no qual os fármacos eram submetidos a testes em 60 linhas celulares

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÉNIO(II)

provenientes de diversos tipos de cancro numa gama muito abrangente.^[07] Este tipo de aproximação experimental tornou-se universalmente utilizado, sendo efectuado através de um rápido ensaio colorimétrico que permite a análise da viabilidade celular das linhas testadas de um modo automático e reproduzível.^[12] Já em finais da década de 80, começou a surgir um novo tipo de aproximação na procura de uma cura para o cancro, a terapia direccionada. Nesta nova perspectiva, os fármacos passaram a ser desenvolvidos em função de alvos predefinidos como factores de crescimento, moléculas sinalizadoras, proteínas do ciclo celular, sinais apoptóticos ou até mesmo moléculas ligadas à angiogénese, como se demonstra pelas diversas classificações feitas para os fármacos existentes (Tabela 1).^[04]

Tabela 1 – Principais fármacos para diversos tipos de cancro (Adaptado de [05]).

Tipo de fármaco	Mecanismo de acção principal	Exemplo(s)	Tipos de tumores nos quais são usados
Agentes alquilantes	Formação de ligações covalentes com o DNA de modo a evitar a sua replicação.	Ciclofosfamida Carmustina Cisplatina	Linfomas não Hodgkin Glioblastoma cerebral Ovário, cabeça, pescoço, pulmonar e testicular
Antimetabolitos	Bloqueio ou destruição de vias de síntese de DNA.		
Antagonistas de folato	Inibição do dihidrofolato reductase, interferindo com a síntese de timidilato.	Metotrexato	Leucemia linfoblástica aguda (ALL)
Análogos de pirimidina	Conversão em nucleótidos (pirimidinas) e inibição da síntese de timidilato.	Fluorouracila	Colo-rectal e gástrico
Análogos de purina	Conversão em nucleótidos (purinas).	Mercaptopurina Tioguanina	Leucemia mieloide aguda (AML)
Antibióticos antitumorais	Interferência com a acção da topoisomerase II, inibindo a síntese de DNA e RNA.	Doxorrubicina	Sarcoma osteogénico, doença de Hodgkin, leucemia crónica mieloide (LCM), sarcoma de tecido liso
	Causa da fragmentação das cadeias de DNA. Intercalação no DNA, interferindo com a RNA polimerase e inibindo a transcrição.	Bleomicina Dactinomicina	Cervical Tumor de Wilms
	Actuação como um agente alquilante.	Mitomicina	Pulmonar
Alcalóides de plantas			
Alcalóides de <i>Vinca</i>	Inibição da mitose na metáfase por ligação à tubulina.	Vincristina, vimblastina	Pulmonar, linfoma não Hodgkin
Podofilotoxinas	Inibição da síntese de DNA por interferência com a topoisomerase II e função mitocondrial.	Etopósido	Pulmonar, sarcoma de Kaposi
Taxóides	Promoção da polimerização da tubulina e inibição da dissociação dos microtúbulos.	Taxol	Ovário, mamário, pulmonar
Camptotecinas	Inibição da topoisomerase I, as RNA e DNA sintetases e a formação de microtúbulos.	Irinotecano, topotecano	Colo-rectal refractário, ovário avançado

Actualmente os agentes anticancerígenos produzidos são melhores e o conhecimento sobre o cancro é muito maior, pelo que se procura conceber novas estratégias que combinem a citotoxicidade dos fármacos e a precisão da terapia direccionada para conseguir tratamentos mais eficientes.^[07]

1.3 Limitações e resistência à quimioterapia

Existem várias condicionantes a ter em conta relativamente a agentes citotóxicos utilizados em quimioterapia. Os enzimas que metabolizam os fármacos ou transportadores dos mesmos desempenham um papel chave na compreensão geral dos processos em que os fármacos estão envolvidos.^[13] Convém atender aos possíveis efeitos secundários que estes compostos possam ter, dado que devem ser o menos tóxicos possível sem que haja uma redução significativa da actividade citotóxica.^[14] Assim, é de grande importância conseguir obter um certo equilíbrio entre a sensibilidade ao fármaco e a resistência das células tumorais para tirar o máximo partido da sua eficiência e minimizar a toxicidade do tratamento.^[15] Apesar da quimioterapia actualmente conseguir prolongar a vida dos pacientes com cancro e ainda lhes proporcionar uma melhor qualidade de vida, é conhecida a sua capacidade de induzir toxicidade. Esta leva à ocorrência de diversos efeitos secundários indesejáveis entre os quais mielossupressão, toxicidade gastrointestinal e alopecia (sobretudo ao nível do cabelo).^[14] Estes efeitos ocorrem sobretudo devido ao facto da maioria dos fármacos utilizados ter como alvo células de rápida divisão, uma característica típica das células cancerosas mas que também distingue alguns tipos de células presentes num organismo são (como as células do cabelo). Em pacientes cujas células cancerígenas não são destruídas em resposta ao tratamento quimioterapêutico está-se na presença da maior limitação à quimioterapia: a existência de mecanismos de resistência ao fármaco.^[16] Esses mecanismos de resistência podem ser classificados de dois tipos,

“inerentes” ou “adquiridos”. Os mecanismos de resistência inerentes limitam a utilização de determinados fármacos, enquanto que os mecanismos de resistência adquirida são relativos a processos induzidos pela administração do fármaco, tornando-o sem efeito.^[17] Outro modo de analisar estes mecanismos de resistência aos agentes anticancerígenos é através das suas relações dose-resposta. Se a célula não possui qualquer tipo de resistência, diz-se que é “sensível” e apresenta um certo declive na curva dose-resposta; se a resistência é “activa” se existir um excesso de algum factor de resistência, provocando um decréscimo da curva dose-resposta (CDR); é “passiva saturável” se existir deficiência de um factor necessário para que haja eficiência do fármaco, dando um limiar à CDR; é “passiva não saturável” caso haja uma qualquer alteração num factor, reflectida numa diminuição no declive da CDR (Figura 2).^[18]

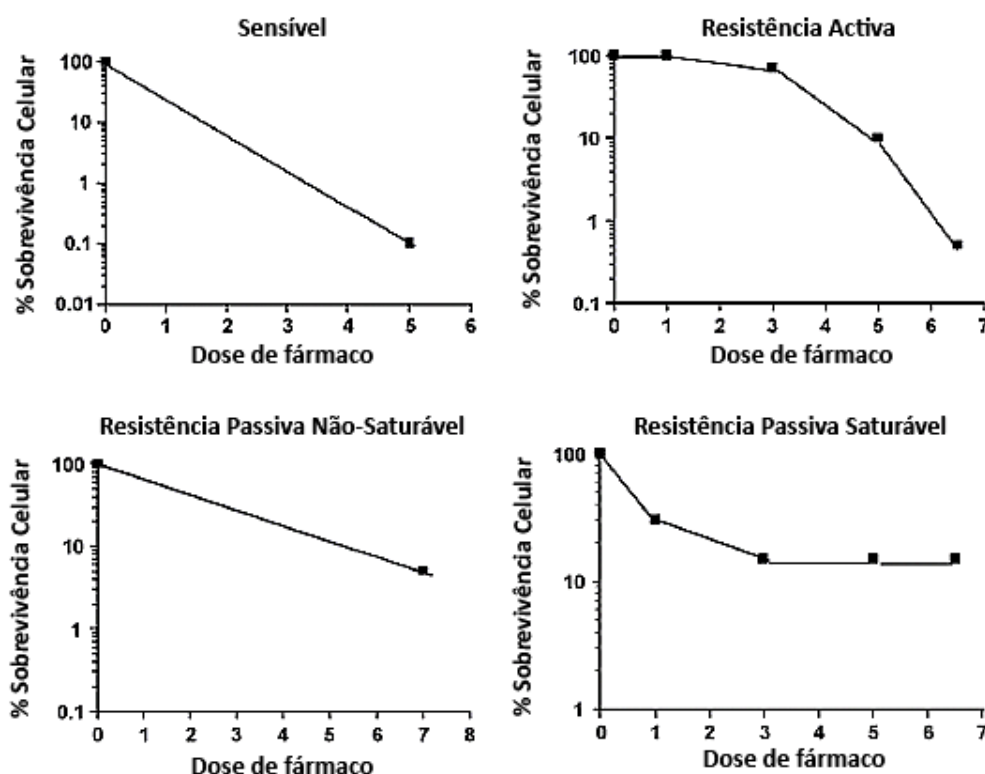


Figura 2 – Diferentes mecanismos de resistência e respectivas curvas dose-resposta (Adaptado de [18]).

Podem ser considerados como exemplos de resistência activa: bombas de efluxo do fármaco, sistemas de reparação do DNA, factores anti-apoptóticos, entre outros. Já

como exemplos de resistência passiva podem considerar-se: absorção do fármaco ou activação de vias metabólicas, factores pró-apoptóticos ou agentes integrantes de cascatas de apoptose, células numa fase sensível do seu ciclo, entre outros. Vários factores próprios do organismo podem igualmente contribuir para a resistência à quimioterapia: fluxo de sangue e direccionamento do fármaco, meio extracelular, absorção, desintoxicação e ligação do fármaco, reparação do DNA, redução da reparação de *DNA mismatch*, redução da resposta apoptótica, inibidores da apoptose, etc.^[16] Para além disto, e apesar de cada um destes mecanismos poder ocorrer sozinho, eles podem suceder de uma forma sinérgica conduzindo assim a multirresistência.^[06] Novos compostos antitumorais têm vindo a ser desenvolvidos para assim ultrapassar estas limitações na quimioterapia.

1.4 Química Medicinal

Sabe-se actualmente que os metais são fundamentais em muitos processos que ocorrem em organismos vivos e curiosamente o seu uso para fins medicinais remonta até aproximadamente 2500 a.C., quando árabes e chineses usavam zinco para promover a cura de feridas e egípcios usavam cobre para esterilizar água.^[19] Na época do Renascimento, na Europa, era usado cloreto mercurioso como diurético e a importância biológica do ferro foi estabelecida no conhecimento científico.^[20] A partir dessa altura, vários relatos descrevem a utilização de metais na medicina. Como já foi referido anteriormente, a utilização do gás mostarda durante a 1ª Guerra Mundial levou à detecção do seu efeito citotóxico e marcou o surgimento efectivo da quimioterapia, tendo mais tarde a descoberta da cisplatina e dos seus derivados revolucionado este campo.^[07] Actualmente, são os fármacos mais utilizados em todo o mundo enquanto principal componente da quimioterapia combinada no tratamento de tumores sólidos.^[21] Com base no conhecimento adquirido iniciou-se a procura de outros compostos contendo metais e com actividade citotóxica. Os metais conseguem ligar-se a fragmentos orgânicos dando origem a complexos, cuja química permite alargar os

horizontes ao nível da medicina dado o grande potencial para o desenvolvimento de agentes antitumorais mais eficientes.^[22] Para além disso, torna-se possível ultrapassar limitações como a reduzida selectividade e a toxicidade dos metais através da formação dos compostos organometálicos, dado que características como os números de coordenação dos metais, o potencial redox, as geometrias de coordenação e as propriedades cinéticas e termodinâmicas têm de ser ponderadas aquando da concepção de agentes quimioterapêuticos adequados à interacção com moléculas biológicas.^[10] O facto dos compostos de platina apresentarem uma elevada toxicidade com variados e severos efeitos secundários e o aparecimento da resistência tumoral ao fármaco levaram ao desenvolvimento de fármacos contendo outros átomos metálicos na sua composição, nomeadamente ruténio, ferro e molibdénio.^[22]

1.5 Compostos de molibdénio

O molibdénio é um elemento químico essencial em variados processos celulares e é normalmente utilizado na célula como co-factor de alguns enzimas importantes, como por exemplo xantina desidrogenase. Em 1979, Köpf e Köpf-Maier relataram as suas descobertas de vários complexos de molibdénio com actividade antitumoral.^[23] Foi o aparecimento dos complexos de molibdénio como agentes citotóxicos contra células cancerosas. Entre estes, encontram-se os polioxomolibdatos (PM), polímeros inorgânicos com molibdénio incorporado, que foram descritos como tendo actividade antitumoral em tumores humanos implantados em murganhos.^[24] Em 2005, investigadores portugueses registaram uma patente a partir de diversos compostos de molibdénio(II) por eles sintetizados, que revelaram ter uma actividade citotóxica muito eficiente contra seis linhas celulares.^[25] Mais recentemente, em estudos efectuados para uma família de compostos de molibdénio(II), foram observadas diferenças no efeito antitumoral entre compostos que continham ligandos diferentes, sem que no entanto fosse concluído algo acerca do componente responsável pela diferença nos resultados entre compostos.^[26] Apesar de todos os estudos desenvolvidos com

complexos de molibdénio, o mecanismo de acção de grande maioria deles continua longe de estar totalmente compreendido. No entanto, o facto do crescimento celular ser travado por acção destes compostos posde indicar que a sua actividade inibitória esteja relacionada com danos ao nível do DNA. Isto poderia ocorrer devido a uma interacção directa do composto com o DNA, como por exemplo através de intercalação na sua dupla hélice, ou por acção de espécies radicalares de oxigénio geradas por agentes químicos.

1.6 Mecanismos de acção de compostos metálicos anticancerígenos

Existe uma grande propensão dos compostos metálicos para interagirem com moléculas biológicas como o DNA, considerado o principal alvo intracelular para os agentes antitumorais.^[27] Por outro lado, os compostos podem também funcionar com inibidores ou moduladores de enzimas e assim bloquear a sua interacção com os seus substratos.^[28] Outro mecanismo possível de acção destes complexos pode ser a geração de espécies reactivas de oxigénio, que podem causar de forma directa ou indirecta danos oxidativos no DNA.^[13] Pode considerar-se que existem dois tipos de interacções entre os complexos metálicos e DNA: interacções covalentes, que levam a uma inibição total de processos envolvendo o DNA e são por norma irreversíveis; e não covalentes, que contrariamente às outras são reversíveis.^[29] Como exemplos de compostos que se ligam covalentemente pode-se citar a cisplatina e os seus análogos (Figura 1), que formam ligações covalentes entre os átomos de platina dos fármacos e os de azoto de alguns pares de bases do DNA.^[27] Existem três principais modos de interacção não covalente com o DNA, por parte dos complexos: ancoragem à fenda menor do DNA, ancoragem à fenda maior e intercalação. É contudo possível que um agente citotóxico apresente mais do que um modo de interacção, como é o caso da actinomicina D.^[30] Esta interacção entre os complexos metálicos e o DNA acaba, em última instância, por provocar a morte celular.^[31] Foi assim sugerida uma classificação para os compostos metálicos com actividade anticancerígena, baseada no seu modo de acção. Esta

classificação é dada de acordo com os complexos em si e não com os seus alvos preferenciais (proteínas, DNA, enzimas, entre outros), uma vez que ainda não se possui um conhecimento vasto e fiável acerca das suas interacções.^[32] Os complexos foram divididos em cinco classes distintas:

- O metal possui um papel funcional;
- O metal possui um papel estrutural;
- O metal funciona como transportador de ligandos;
- O metal funciona como catalisador;
- O metal funciona como fotossensibilizador.

Como já foi referido, a cisplatina caracteriza-se por interagir directamente com o DNA, estabelecendo (através do metal) ligações cruzadas entre bases de guanina adjacentes na mesma cadeia conduzindo à apoptose celular, pelo que se engloba na primeira categoria.^[19] A actividade citotóxica dos compostos desta categoria depende especialmente dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos do centro metálico, bem como da natureza do ligando acoplado; contudo, a principal desvantagem desta classe prende-se com a elevada toxicidade provocada pela grande reactividade destes compostos para com os mais variados componentes celulares. A segunda categoria, por seu lado, caracteriza-se pelo facto dos seus compostos não se ligarem directamente ao alvo biológico e serem normalmente menos tóxicos que os compostos de acção funcional; um exemplo de um complexo desta classe é a ferroquina.^[32] Os compostos da terceira categoria transportam um ligando de modo a que este seja distribuído *in vivo*, sendo este assim protegido até chegar ao seu destino. Já os complexos do quarto tipo estão normalmente associados à geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS), causadoras de danos celulares.^[13] Outros compostos necessitam ainda de ser primeiramente fotoactivados para se tornarem activos citotoxicamente, como por exemplo os complexos de ruténio com ligandos de polipiridina.^[27] Apesar das várias categorias criadas, todos os agentes antitumorais actualmente utilizados na prática

medicinal pertencem à primeira categoria e nenhum outro, seja de que classe for, está perto de entrar em uso clínico num futuro próximo apesar dos esforços efectuados em pesquisa, dado que os compostos sob avaliação clínica mais avançada são igualmente desta categoria.^[32]

1.7 Abordagens experimentais utilizadas

Para estudar a capacidade citotóxica dos compostos e o seu provável mecanismo de acção para inibir a proliferação celular, várias abordagens podem ser utilizadas em diferentes estudos, com particular relevo para aqueles que analisam possíveis interacções entre DNA e os complexos metálicos (ver secção 1.6).^[33] Neste trabalho efectuaram-se inicialmente vários ensaios de citotoxicidade, quer para determinação do IC₅₀ de cada composto para cada tipo de células, quer para análise do seu efeito inibitório ao longo do tempo que está presente no meio em contacto com a linha celular. Foi igualmente analisada a estabilidade do composto em solução, através de espectrofotometria de absorção e por espectrometria de massa, fundamental para a compreensão do estado em que se encontra o complexo no meio. Foi ainda analisada a quantidade de molibdénio, o metal presente nos compostos estudados, a nível intracelular para avaliar a possível entrada do composto na célula e a sua dependência da dose administrada. Avaliaram-se igualmente as possíveis interacções dos complexos com a membrana celular, através da determinação dos seus coeficientes de partição octanol/água e da sua condutividade eléctrica. Por fim, estudaram-se as interacções “in vitro” entre os vários compostos com o DNA por electroforese de agarose e por titulações de DNA seguidas por espectrometria de absorção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Compostos de Molibdénio

Os compostos organometálicos utilizados neste trabalho, **B2** e **T1**, foram complexos de molibdénio (II), diferindo em dois ligandos neutros e dois ligandos iónicos diferentes, de acordo com as estruturas apresentadas em [26]. Para a síntese do composto **T1** foi efectuada uma reacção entre o precursor desta família de compostos de molibdénio, $[\text{Mo}(\eta^5\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2(\text{MeCN})_2\text{Br}]$ (previamente fornecido pelo grupo de Química Inorgânica e Teórica da FCUL), com o ligando 1,10-fenantrolina (ligando 1 – **L1**). A síntese do composto **B2**, por sua vez, foi obtida através da reacção do já referido precursor com o ligando 2,2'-bipiridil (ligando 2 – **L2**) e posterior reacção do produto obtido com triflato de tálio para proceder à troca do ligando brometo por triflato. As estruturas dos compostos **B2** e **T1**, do precursor e ligandos **L1** e **L2** utilizados nos vários ensaios encontram-se representadas na Figura 3.



Figura 3 – Estruturas dos vários complexos utilizados nos estudos: precursor; composto **T1**; composto **B2**; ligando **L1**; ligando **L2**.

2.2 Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas nestes estudos, todas elas de origem humana, provêm de culturas primárias, imortalizadas por modificações genéticas, de crescimento rápido e contínuo desde que sob condições adequadas para a sua proliferação (ilimitada

ou limitada a um número elevado de passagens). Para este trabalho usaram-se três diferentes linhas celulares:

- **HeLa** – linha celular derivada do epitélio do adenocarcinoma humano do colo do útero. Foi pela primeira vez isolada em 1951 a partir de uma paciente afro-americana (Henrietta Lacks, que daria nome à linha celular) e, através de análises subsequentes de patologia e fenótipo, foi identificada como um adenocarcinoma raro. Devido ao facto de ter sido uma das primeiras a ser vastamente cultivada é muito resistente, com uma adaptação muito forte às condições de cultura a que é sujeita.
- **MCF-7** – linha celular derivada do epitélio do adenocarcinoma mamário. Foi isolada a partir de uma mulher com cancro de mama metastático, tendo desde cedo sido reportadas algumas variações clonais como por exemplo em resposta ao estrogénio (origina alterações fenotípicas). Este modelo celular é considerado representativo do cancro da mama ER(+).^[34] Uma das principais características desta linha celular é a resistência que apresenta ao tratamento, nomeadamente à cisplatina e à doxorrubicina.^[35]
- **RPE** – linha celular derivada do epitélio pigmentado da retina do olho humano. Este é um modelo celular estável mais aproximado daquilo que vulgarmente se designa por “células normais”, embora tenham sido sujeitas a uma mutação genética (expressão de transcriptase reversa de telomerase humana de forma exógena) para lhe atribuir uma indefinida duração de vida e um fenótipo normal.^[36]

2.3 Equipamento e cuidados laboratoriais

Para a manutenção das culturas celulares é essencial o trabalho em condições de esterilidade/asepsia. Assim, utilizou-se uma sala de cultura (isolada e limpa frequentemente) munida de uma câmara de fluxo laminar (Esco, *Class II Biohazard Safety Cabinet*), uma incubadora de CO₂ (Shel Lab) e um microscópio óptico (Motic Type 101 M). A câmara de fluxo laminar permite trabalhar em condições de esterilidade e proteger tanto o operador como o meio envolvente de quaisquer riscos provenientes do manuseamento deste tipo de culturas celulares, bem como os próprios produtos manipulados. As células, para crescerem e se multiplicarem saudavelmente, devem estar igualmente sob um ambiente controlado (isto para além do suporte da cultura). Essa é a base da utilização da estufa incubadora, que garante um ambiente constante e reproduzível para o seu crescimento: temperatura de 37°C, humidade relativa de 90% e quantidade atmosférica de CO₂ (no seu interior) de 5%, assegurando assim um pH aproximado de 7. Quanto ao microscópio óptico, ele permite uma frequente análise qualitativa visual para controlo do devido crescimento das culturas celulares e detecção antecipada de possíveis contaminações. O operador deve sempre utilizar luvas descartáveis e bata e desinfetar as mãos com álcool a 70% antes de utilizar a câmara, bem como todos os reagentes e utensílios antes de irem para o seu interior. Dentro da câmara deve estar apenas o material essencial para o trabalho a efectuar de modo a não perturbar o fluxo de ar no interior da mesma, com todo o material descartável (pipetas, pontas, caixas, frascos) a ser recolhido, desinfetado com lixívia e descontaminado na autoclave.

2.3 Meio de cultura e soluções usadas em passagens celulares

O meio de cultura utilizado, determinante para o bom desenvolvimento e contendo diversos componentes essenciais ao crescimento celular, foi o meio RPMI 1640 (Lonza) suplementado com: 10 % de FBS (Cambrex), 5 % de L-glutamina (Lonza) e 5 % de antibiótico (P/S: penicilina/estreptomicina, Lonza). De referir que o meio

suplementado de cultura foi armazenado a 4°C e que antes de cada utilização foi previamente aquecido a 37°C.

Aquando da passagem celular entre diferentes suportes, foram usadas duas soluções distintas. Foi utilizado tampão PBS 1x (Lonza) para proceder à remoção de vestígios de meio consumido em contacto com as células, bem com tripsina (Lonza) para hidrolisar as ligações de proteínas de adesão ao suporte e assim libertar as células para a passagem para um novo suporte. É de referir que a solução de PBS foi armazenada a 4°C e a solução de tripsina a -8°C, e que todas as soluções foram aquecidas a 37°C antes de terem sido utilizadas.

2.4 Tripsinização e passagem celular

A preparação de subculturas celulares, vulgarmente conhecida por passagem celular, é fundamental para assegurar a propagação das linhas celulares em diferentes suportes de modo a obter células em quantidade suficiente para a realização dos diversos ensaios. Para tal, é necessário que haja primeiro uma boa confluência de células no suporte onde se encontram (80-90 %) e que as soluções e meio a utilizar estejam à temperatura celular ideal (37°C) para dar início ao processo.

Começou-se por remover o meio (já consumido) com o cuidado de não retirar por toque células agarradas ao suporte. Em seguida, lavou-se a cultura com PBS e depois adicionou-se tripsina em quantidade suficiente (cerca de 2 mL) para abranger toda a cultura celular, colocando-se as placas na estufa. Após uma incubação de cinco minutos, foi novamente adicionado mais PBS para ressuspender o máximo de células soltas e transferiu-se todo o conteúdo para um tubo estéril de 15 mL. A partir daí, colocou-se cerca de 1/5 do volume total por cada placa P100 (Orange Scientific, *OrDish* modelo 100mm, área 60,09 cm²) ou cada frasco *OrCap* de 150 cm² (Orange Scientific) e adicionou-se meio de crescimento.

2.5 Contagem de células

Após a obtenção de uma suspensão celular é possível saber aproximadamente o nº de células que se tem num determinado volume, o que facilita bastante a preparação de diversos ensaios no sentido de aumentar a reprodutibilidade do mesmo. Assim, depois de homogeneizar a suspensão celular para evitar aglomerados celulares ou sedimentação, colocou-se uma pequena amostra (por capilaridade) nas duas câmaras de contagem de uma câmara de *Neubauer* ou hematocitómetro. Em seguida, recorreu-se a um contador estatístico (TAMACO) para contar, através do microscópio óptico, o número de células presentes na grelha mais densa (125x125 quadrículas) de cada uma das câmaras de contagem, correspondendo à depressão de cada uma com volume de 10 µL. Deste modo, consegue-se uma contagem bastante precisa da quantidade de células em suspensão de acordo com a seguinte relação:

$$Total\ células / mL = média\ do\ n^{\circ}\ células\ contadas \times 1mm^2 \times 10^4$$

2.6 Crio-preservação e descongelamento

A crio-preservação consiste no armazenamento de material biológico em azoto líquido a -196°C, para uma preservação a longo prazo, ou a -80°C, para uma preservação a curto prazo sendo esta última a desejada. O seu propósito foi criar stocks das várias linhas celulares de modo a evitar a necessidade de ter linhas celulares indefinidamente em cultura e precaver a possibilidade de ocorrer a contaminação (e consequente morte) de todas as células.

Para preparar stocks celulares, preparou-se uma suspensão celular por tripsinização. Em seguida, transferiu-se o conteúdo para um microtubo e centrifugou-se a 900 g durante 10 minutos. Depois rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em microtubos estéreis (Cryovial Simport) em 10% de DMSO (Merck) e 90% de FBS, sendo imediatamente colocados no refrigerador Mr.Frosty (Nalgene). O

refrigerador é composto por um anticongelante (isopropanol) que possibilita variações lentas e controladas de temperatura ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), minimizando assim quaisquer danos às células. Por fim, armazenou-se o refrigerador com os stocks numa arca congeladora (-80°C).

Para proceder ao descongelamento das culturas celulares, o refrigerador foi retirado da arca congeladora e deixado à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. Em seguida, retiraram-se os microtubos com as suspensões celulares do refrigerador e incubaram-se durante um minuto à temperatura ambiente e outro minuto numa banho a 37°C (temperatura óptima celular). Colocou-se então a suspensão celular numa placa de P100 e adicionou-se 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado (previamente aquecido igualmente a 37°C), incubando por fim na estufa de ambiente controlado.

2.7 Preparação de soluções

Os compostos a estudar foram dissolvidos em DMSO (Merck) para uma concentração final de 50 mM (soluções de base). Como se pretendia fixar a percentagem de DMSO presente em cada solução a aplicar nos ensaios de citotoxicidade em 0,5%, prepararam-se soluções de composto (denominadas soluções originais) dentro de uma gama de concentrações definida (0,2-40 mM) de modo a que posteriormente apenas se adicionassem 10 μL de cada uma destas soluções a meio de cultura RPMI 1640 de modo a perfazer 2 mL, obtendo-se as concentrações desejadas (0-200 μM). Paralelamente foi feita uma solução de controlo apenas com DMSO com a percentagem desejada.

Para o ensaio de MTT, foi elaborada uma solução do substrato em questão em meio de cultura com uma concentração de 0,5 mg/mL, tendo-se para tal dissolvido directamente o composto em meio RPMI 1640.

2.8 Ensaios de citotoxicidade/cinética de incubação

O objectivo primário do estudo destes compostos organometálicos passa pela avaliação da sua capacidade de promover a morte celular. Esta caracterização é feita através da determinação do respectivo IC_{50} , um parâmetro que define a concentração de composto necessária para inibir o crescimento da totalidade das células em 50 %. É a concentração em que apenas metade das células tratadas com o complexo sob estudo sobrevive. Assim, torna-se necessário testar as várias linhas celulares em contacto com os compostos em estudo e analisar a sobrevivência celular ao tratamento. Essa mesma sobrevivência é verificada através do ensaio de MTT, que permite analisar por espectrofotometria a viabilidade celular após o tratamento com os compostos.^[12] Este ensaio colorimétrico baseia-se na redução do substrato, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difenilotetrazólio (Aldrich), pelo enzima mitocondrial succinato desidrogenase, numa reacção que leva paralelamente à oxidação de NADH ou NADPH.^[37] O enzima transforma o MTT (pó amarelo solúvel em solventes aquosos) em formazano (pequenos cristais de cor roxa insolúveis nesse tipo de solventes). Como tal, foi necessária a sua dissolução em DMSO (solvente orgânico) para posterior análise por espectrofotometria. É de referir que este processo apenas ocorre em células metabolicamente activas, pelo que este método se torna ideal para analisar a viabilidade celular apesar de não fazer distinção entre apoptose e necrose.^[37]

Para efectuar este ensaio começou-se por determinar a quantidade de suspensão celular necessária para aplicar aproximadamente o mesmo número de células nas microplacas de 96 poços (*OrPlate*, Orange Scientific). Após a contagem das células no hematocitómetro procedeu-se à preparação de soluções celulares em meio RPMI 1640 em placas P100 para em seguida aplicar às microplacas, 100 μ L a cada poço e aproximadamente 750.000 células por microplaca. Posteriormente as microplacas com as células semeadas incubaram durante cerca de 48h na estufa de ambiente controlado (37°C, 5% CO₂) para crescerem. Passado esse tempo, o meio de cultura nos poços foi substituído por 100 μ L (por poço) das soluções previamente preparadas de

meio de crescimento com composto dissolvido, para a gama de concentrações escolhida; foram igualmente aplicadas as soluções de controlo, que consistiam em meio de crescimento normal, para eliminar a possibilidade de morte celular devido a algum factor externo às soluções, e meio contendo a mesma quantidade do solvente em que os compostos originalmente se encontravam dissolvidos, para entrar em consideração com a morte celular provocada por efeitos do solvente. Todas as substituições de soluções foram feitas de acordo com o esquema da Figura 4, sendo em seguida as microplacas novamente colocadas na estufa de ambiente controlado.

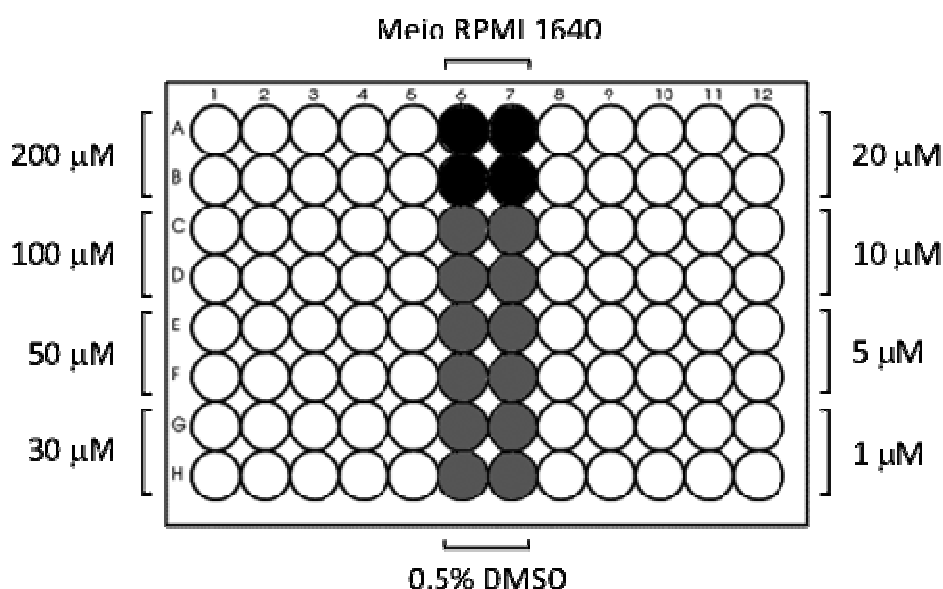


Figura 4 – Esquema representativo da aplicação das soluções de compostos e respectivos controlos numa microplaca de 96 poços.

Depois das 48 horas de incubação das células com os compostos, substituiu-se o meio de cultura que se encontrava na microplaca (já consumido a nível de nutrientes e componentes de crescimento) por solução de MTT em meio de cultura previamente preparada (100 µL por poço), voltando a incubar a microplaca por 2 horas. No fim desse tempo, retirou-se o meio de cultura em contacto com as células e adicionou-se 200 µL de DMSO a cada poço para dissolver os cristais de formazano, sendo em seguida

efectuada a leitura dos poços no leitor de microplacas (Tecan Sunrise) a 530 nm (670 nm de referência) após agitação interna de 2 segundos.

Foram efectuados igualmente ensaios de cinética de incubação, de modo a compreender melhor a acção dos compostos e analisar a partir de que tempo de incubação estes apresentavam uma maior eficiência em reduzir a viabilidade celular. Estes ensaios são iguais ao ensaio de citotoxicidade, sendo as diferenças o tempo que o composto se encontra em contacto com as células e a utilização apenas da linha celular HeLa para este tipo de ensaio. Assim, foram escolhidos os intervalos de tempo de 1, 2, 24 e 48 horas de incubação. Prepararam-se microplacas com as células e meio de cultura e incubaram-se 48 horas na estufa de ambiente controlado. Depois desse tempo, substituiu-se o meio nos poços da microplaca pelas diversas soluções de compostos e pelos respectivos controlos (já referidos acima). Colocaram-se então as microplacas em incubação na estufa e, ao fim de cada tempo escolhido, efectuou-se a substituição das soluções da microplaca por meio de cultura normal. Passadas 48 horas após a aplicação de compostos às células, efectuou-se o ensaio de MTT e leram-se as absorvências das microplacas.

A partir das absorvências dos poços da microplaca foi possível calcular a taxa de sobrevivência celular através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\text{Abs} (n^{\circ} \text{ células vivas (tratadas com composto)})}{\text{Abs} (n^{\circ} \text{ células vivas (controlo)})} \times 100$$

A partir destas percentagens de sobrevivência celular para cada concentração (e para o controlo) calculou-se então para cada composto os valores de IC₅₀, que como já foi referido corresponde à concentração de composto necessária para, nas mesmas condições de ensaio, inibir o crescimento/viabilidade celular em metade. Assim, obteve-se, através de uma regressão não linear, o valor de IC₅₀ para cada composto e para cada tempo de incubação das células com o mesmo (isto nos ensaios cinéticos), bem como o erro associado e a respectiva curva de citotoxicidade.

2.9 Quantificação de molibdénio intracelular

Para tentar compreender o mecanismo de acção dos compostos foi quantificado o molibdénio intracelular, como meio de estudar a entrada destes compostos na célula.

Após o processo de tripsinização e obtenção de uma suspensão celular, começou-se por semear células em placas P100 com meio de crescimento (densidade celular de aproximadamente 4×10^4 células por placa) e em seguida colocaram-se a incubar durante cerca de 48 horas na estufa de ambiente controlado. Passado esse período, substituiu-se o meio por soluções de meio com concentrações de composto de 0, 10, 50 e 100 μM , tendo-se voltado a incubar durante 48 horas. No final desse tempo, foi efectuada a tripsinização de acordo com o que já foi descrito e obtiveram-se suspensões das células tratadas com os compostos, para cada concentração. Em seguida, centrifugaram-se as suspensões e efectuou-se uma lavagem das células com novo volume de PBS. Os microtubos com as amostras foram depois selados com parafilme e enviadas para a Universidade de Vigo, onde foram sujeitas a secagem durante a noite, aquecimento num forno a 600°C (para eliminação de matéria orgânica), digestão por tratamento com peróxido de hidrogénio, ácido clorídrico e ácido nítrico (na proporção 1:1:1) seguida de sonicação e quantificação do molibdénio intracelular por ICP-MS.

2.10 Estabilidade dos compostos em solução

Foi avaliada a estabilidade dos compostos **T1** e **B2** em solução por espectrometria de absorção e por espectrometria de massa para uma solução aquosa com 0,5 % de DMSO, para analisar uma possível degradação dos mesmos.

As medidas de espectrometria de absorção foram efectuadas em células de quartzo com um percurso óptico de 1 mm e à temperatura de 37°C, para simular a temperatura celular. Para estes ensaios de estabilidade, as soluções de composto foram feitas a partir das soluções de composto em DMSO previamente preparadas nos ensaios

de citotoxicidade, de modo a permitir preservar a percentagem desejada de DMSO às concentrações usadas para estes ensaios. Assim, foram preparadas soluções 20 μ M de cada composto em água (com 0,5 % de DMSO). As leituras foram efectuadas num espectrómetro Shimadzu UV-2450 equipado com um controlador de temperatura Peltier. Recolheu-se o espectro do composto de 5 em 5 minutos durante a primeira meia hora do ensaio e, a partir daí, a cada 15 minutos até completar 3 horas. Para as medidas de espectrometria de massa, foram colocadas a incubar na estufa de ambiente controlado soluções aquosas iguais às acima referidas. Foram efectuadas as leituras num espectrómetro de massa ApexQe FTICR (Bruker Daltonics) para tempos de incubação das soluções correspondentes a 0, 1, 2, 24 e 48 horas para cada composto e analisados os espectros resultantes.

2.11 Condutividade

Para garantir a determinação correcta do coeficiente de partição octanol/água (ver secção **2.12**), foi necessário verificar a estabilidade dos compostos em água. Para isso, mediu-se a condutividade eléctrica dos compostos para verificar a formação de espécies iónicas em solução, que influenciariam os valores dos coeficientes de partição calculados tornando-os coeficientes de distribuição. Para isso, foram utilizados um condutímetro (*Radiometer Copenhagen*, Meterlab CMD 230) e uma célula de condutividade (*Radiometer Copenhagen* CDC 641 T) que permitem a medição directa do valor da condutividade de uma solução. Este valor foi obtido através da diferença de potencial, medida nos eléctrodos de platina da célula quando submersos na solução, resultante da aplicação de uma corrente alterna de intensidade.

Os compostos começaram por ser dissolvidos em octanol saturado previamente com água, para uma concentração final de 50 μ M, tendo sido sujeitos ainda a 15 minutos de sonicação para assegurar a sua solubilização. Foi medida a condutividade de uma solução controlo, de octanol saturado, para servir de referência. Em seguida, foram medidas as condutividades das soluções de composto e comparadas com o valor de

controlo. É de referir que cada experiência foi repetida 5 vezes e que entre a medição das várias soluções a célula de condutividade foi lavada com a solução controlo.

2.12 Determinação do coeficiente de partição octanol/água

Para compreender o modo de interacção destes compostos com a membrana celular e a sua capacidade de entrar na célula, determinaram-se os respectivos coeficientes de partição octanol/água. Estes coeficientes permitem avaliar a hidrofobicidade/hidrofiliicidade de um composto quando sujeito a dois solventes de natureza diferente (aquosa e orgânica), sendo determinados por espectrometria de absorção.

O ensaio foi iniciado através da saturação de octanol com água e vice-versa. Agitou-se um volume igual de octanol (Merck) com água *millipore* durante 5 horas. Em seguida, transferiu-se a mistura para uma ampola e esperou-se pela separação das fases durante um mínimo de 24 horas, tendo-se recolhido ambas no final. Determinou-se a absorvência de soluções de composto a 20 μ M preparadas em octanol saturado (preparadas como descritas em **2.11**) até estas apresentarem valores estáveis para os picos de absorção (299 nm para o composto **B2** e 272 nm para o composto **T1**). Foi então medido o valor do pH da fase aquosa anteriormente obtida. Em seguida, fizeram-se misturas das soluções de cada composto em octanol saturado com solução de água saturada com octanol, nas proporções de 3:40 e 6:40 (duas experiências independentes), e colocadas sob agitação suave e constante durante cerca de 90 minutos. No fim desse tempo, as misturas foram centrifugadas a 3000 g durante 5 minutos para separar as fases e mediram-se novamente as absorvências das fases orgânicas das diferentes experiências nos mesmos comprimentos de onda medidos anteriormente. Por fim, mediu-se o pH das fases aquosas para avaliar a sua variação ao longo da experiência.

2.13 Extracção e análise de DNA plasmídico por electroforese

É costume recorrer-se a electroforeses em gel de agarose para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA, através da aplicação de uma diferença de potencial ao gel. Consoante o tamanho dos fragmentos desejados ou do DNA utilizado é adaptada a porosidade do gel, sendo esta definida pela quantidade de agarose nele presente. É igualmente incorporado no gel um fluoróforo que permita a identificação desses fragmentos pela sua coloração, tendo neste estudo sido utilizado o brometo de etídio (BrEt) por se intercalar no DNA e por ser visível mediante radiação UV. Utiliza-se DNA plasmídico neste ensaio por ser mais pequeno e existir em elevada quantidade em bactérias/leveduras, sendo por isso mais fácil de obter. O plasmídeo utilizado neste estudo foi o **pYES2**, um plasmídeo de leveduras vulgarmente usado em expressão bacteriana, com um tamanho de cerca de 5,9 kb e que apresenta resistência à ampicilina.

O ensaio foi iniciado pela obtenção do DNA plasmídico a partir de uma cultura bacteriana. Inoculou-se meio LB com uma colónia bacteriana previamente escolhida e deixou-se a incubar sob agitação durante a noite. Em seguida, foi extraído o DNA da cultura bacteriana com um kit de extracção/purificação de DNA em plasmídeos (GE Healthcare) de acordo com o protocolo fornecido no mesmo, tendo-se armazenado a -4°C. Depois de se obter o DNA, preparou-se o gel de agarose para a electroforese. Foi feito um tampão próprio para o ensaio, TAE (tris base 4 M, acetato de sódio 1 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8), no qual se dissolveu a agarose a 1 % (m/V) e brometo de etídio (1 µg/mL), para preparar o gel, tendo este tampão sido também colocado na câmara de electroforese. O gel foi preparado por aquecimento sob agitação, com o cuidado de não deixar solidificar. Foi vedado convenientemente o tabuleiro da tina de electroforese e colocado o pente para um correcto alinhamento dos poços. Depois verteu-se a solução de agarose ainda líquida para o tabuleiro e deixou-se solidificar o gel, removendo-se em seguida o pente e o material utilizado para vedar. Colocou-se o tabuleiro na tina de electroforese de acordo com a direcção de migração desejada (poços no lado do pólo

negativo) e encheu-se a tina com tampão TAE até cobrir na totalidade o gel. Aplicaram-se então as várias amostras no gel, tendo-se escolhido estudar o efeito de três concentrações distintas de composto (10, 50 e 100 μM). As amostras aplicadas consistiam numa pequena porção de DNA plasmídico, composto em diferentes concentrações e azul de bromofenol (em todas as amostras excepto nos marcadores) como tampão de corrida no gel (para se seguir visualmente a migração das amostras). Todas as amostras aplicadas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora antes de aplicar. Após o fecho da câmara de electroforese, aplicou-se uma diferença de potencial de 80 V ao gel e deixou-se a electroforese a correr durante cerca de hora e meia. No final do tempo, retirou-se o gel da câmara de electroforese e visualizaram-se as bandas de DNA através de radiação UV.

2.14 Titulação de DNA por Absorção

A espectroscopia de absorção é habitualmente utilizada por permitir estudar possíveis interacções de compostos com DNA, por análise de variações do espectro de absorção do composto por titulação com DNA.^[38] Ao manter a concentração de composto constante, é possível verificar se o composto se encontra a interagir com o DNA que é adicionado gradualmente através das modificações no seu espectro de absorção. Estas modificações podem sugerir o tipo de interacção que pode eventualmente existir *in vivo*, caso o composto entre na célula e chegue ao núcleo.

Começou-se por obter o coeficiente de extinção molar de cada composto, tendo para isso preparado-se soluções a diferentes concentrações e medidos os valores de absorvência no respectivo pico máximo de absorção. Em seguida, preparou-se uma solução de DNA com uma concentração elevada por dissolução de DNA de esperma de salmão (Sigma) em tampão Tris-NaCl. Em seguida analisou-se a concentração e grau de pureza da solução inicial de DNA, através da razão de absorvências a 260nm por 280 nm, tendo sido preparada uma nova solução de DNA em tampão Tris-NaCl a partir da anterior solução de DNA, agora 20 μM . Foi preparada uma solução de cada composto

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÉNIO(II)

20 μM em tampão Tris-NaCl (5 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,2) com 0,5 % de DMSO (obtida como já descrito anteriormente), com a respectiva solução de controlo a ser paralelamente feita (apenas 0,5 % de DMSO em tampão). Depois, foi observado o espectro de absorção do composto em tampão (com 0,5 % de DMSO), tendo como referência uma solução de tampão com a mesma quantidade de DMSO. Após esta medição, foram adicionados vários volumes da solução de DNA 20 μM de modo a aumentar a concentração de DNA no ensaio numa gama desejada (10-200 μM). A cada adição, foi novamente analisado o espectro de absorção do composto, bem como o valor obtido para o respectivo comprimento de onda máximo de absorção. É de referir que também se adicionou DNA à célula de referência, eliminando assim a presença de DNA do espectro observado.

3. TRATAMENTO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1 Ensaios de citotoxicidade/cinética de incubação

Os ensaios de citotoxicidade são de vital importância para o início de qualquer estudo biológico de um composto que se pretende que chegue ao mercado de fármacos anticancerígenos. Numa primeira análise, é importante comparar os valores de IC₅₀ de cada complexo, representativos da sua actividade citotóxica, com os dos respectivos ligandos, para se averiguar acerca da sua utilização como base de um possível fármaco quimioterapêutico bem como a capacidade dos ligandos por si provocarem a morte celular. Pretende-se também avaliar as diferenças para os compostos da mesma família que já foram totalmente testados, os compostos **B1** e **T2** (Figura 5).^[26] Assim, foram efectuados estudos de citotoxicidade, através do ensaio do MTT, quer para os ligandos isolados quer para os compostos **T1** e **B2** (Figura 5) numa gama de concentrações de 1 µM até 200 µM. A gama baixa de concentrações escolhida prende-se com o facto de se tentar sempre administrar uma dose mínima de fármaco ao paciente (isto a nível clínico) para de certo modo minimizar os efeitos secundários resultantes dessa administração.

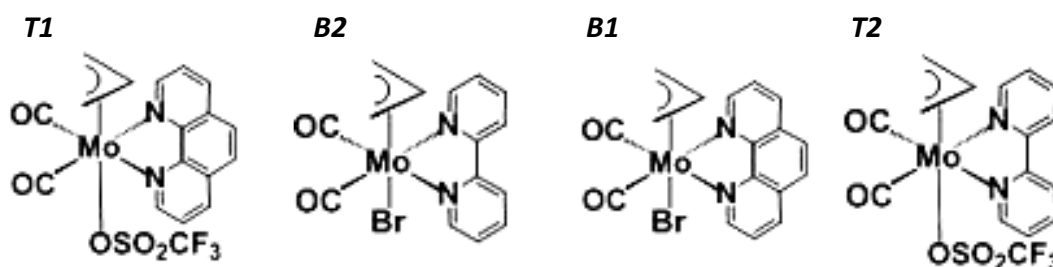


Figura 5 – Da esquerda para a direita, compostos **T1**, **B2**, **B1** e **T2** (os dois últimos retirados de [26]).

Estes testes foram efectuados em três linhas celulares diferentes (HeLa, MCF-7, RPE). Deste modo, obtiveram-se as viabilidades celulares para cada concentração de

composto em cada linha celular e puderam comparar-se as actividades, dado que todas foram sujeitas ao mesmo tempo de exposição ao composto. São apresentados na Figura 6 os gráficos de viabilidade celular obtidos em cada ensaio de citotoxicidade, sendo estes respeitantes aos estudos na linha celular HeLa. Os mesmos gráficos obtidos para os compostos B2 e T1 nas linhas celulares MCF-7 e RPE estão em Anexo na Figura 30.

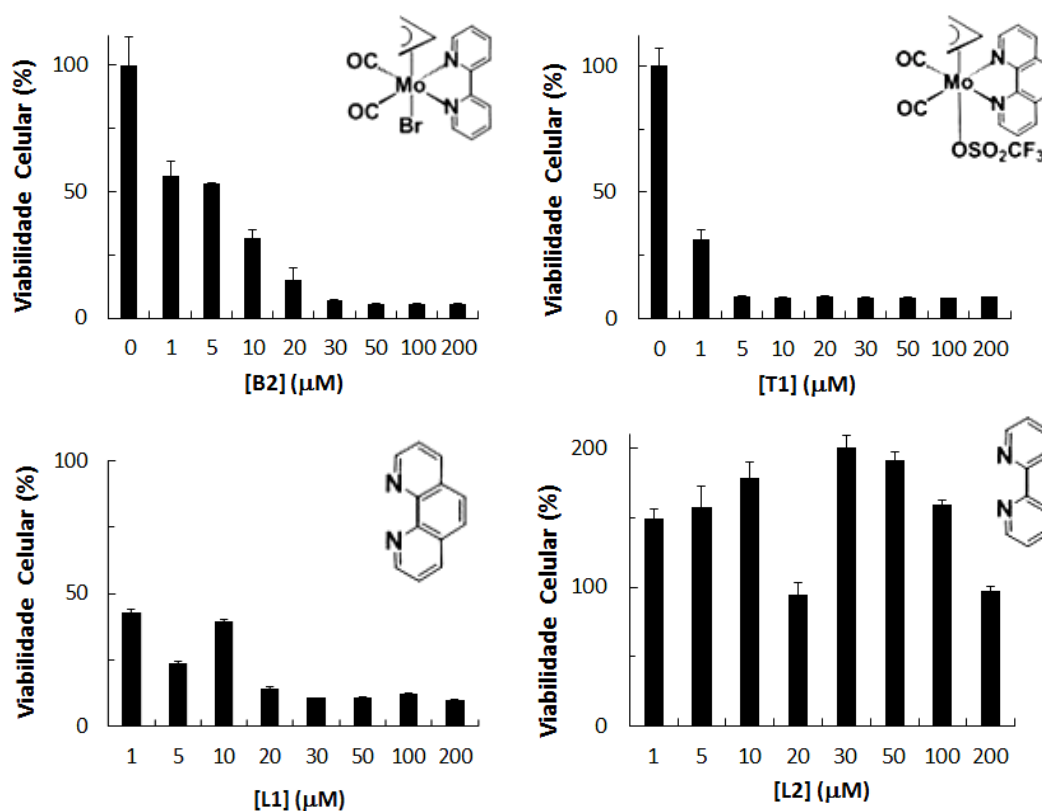


Figura 6 – Gráficos de viabilidade celular em células HeLa para os estudos citotóxicos efectuados com os diferentes compostos.

Obtiveram-se resultados nas restantes linhas celulares para os compostos **T1** e **B2** que se puderam comparar com os outros valores de IC_{50} resultantes. Estes valores estão apresentados na Tabela 2 e sob a forma de gráfico de barras na Figura 7.

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÊNIO(II)

Tabela 2 – Valores de IC_{50} (μM) obtidos nos ensaios de citotoxicidade para as diversas linhas celulares.

IC_{50} (μM)	HeLa	MCF-7	RPE
L1	25,4	-	-
L2	n.d.	-	-
T1	0,65	0,66	4,34
B2	3,62	7,92	23,30

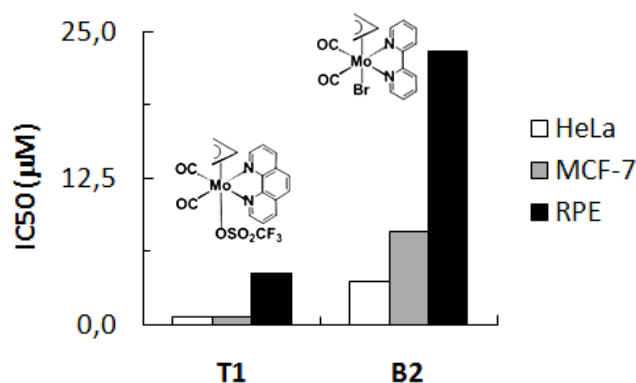


Figura 7 – Gráfico dos valores de IC_{50} obtidos para os dois compostos nas várias linhas celulares testadas.

Os valores de IC_{50} obtidos para os compostos são semelhantes, embora os do complexo **T1** sejam inferiores aos do **B2** nas linhas celulares testadas o que revela uma maior eficácia citotóxica; como era esperado, ambos os compostos mostraram ser mais eficientes que os ligandos isolados (inclusivamente para o **L2** não foi possível calcular um valor de IC_{50}). Os valores variam também entre as várias linhas celulares tratadas com o mesmo composto, ainda que estas variações sejam bastante ligeiras. A linha celular HeLa parece ser a mais sensível a esta família de complexos, uma vez que é nela que os valores de IC_{50} são mais baixos, e a linha celular RPE (a mais próxima dum modelo de células normais) aparenta ser a mais resistente a este tipo de complexos. Estes valores são ainda interessantes do ponto de vista farmacêutico dado que são ambos bastante baixos e comparáveis com a gama de valores quer da cisplatina^[40] (embora noutras linhas celulares mas da mesma gama em geral) quer dos compostos da mesma família já anteriormente referidos.^[26] Por comparação com os últimos, verifica-se que os compostos que contêm o ligando **L1** apresentam IC_{50} inferiores ao compostos

que contêm o ligando **L2**, independentemente do ligando aniónico a que estejam associados. Estes resultados confirmam assim a relevância do ligando neutro utilizado no efeito antitumoral do composto, aquando da sua concepção.

Foram igualmente efectuados ensaios de modo a analisar o tempo de exposição aos compostos que seria necessário para que a viabilidade celular da linha celular HeLa (única utilizada neste estudo) decrescesse consideravelmente. Obtiveram-se assim valores de IC_{50} em três ensaios independentes, resultando no valor médio e respectivo erro-padrão para cada composto apresentado na Tabela 3 e nas diferenças verificadas através do gráfico da Figura 8.

Tabela 3 – IC_{50} (μM) dos compostos após diferentes tempos de incubação com células HeLa.

IC_{50} (μM)	1 hora	2 horas	24 horas	48 horas
T1	$6,9 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
B2	$8,3 \pm 3,0$	$10,4 \pm 2,1$	$21,6 \pm 4,2$	$10,4 \pm 2,1$

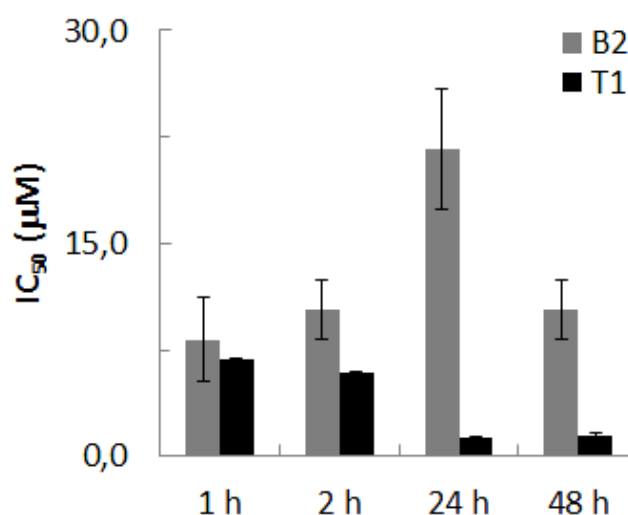


Figura 8 – Gráfico comparativo dos valores de IC_{50} e respectivos erros-padrão dos compostos **T1** e **B2** após diferentes tempos de incubação na linha celular HeLa.

Através destes valores é visível que o tempo de incubação tem importância no efeito citotóxico que os compostos exercem nas células. Verificou-se que, a partir de um período de tempo mínimo, o **T1** já é totalmente eficiente a nível citotóxico, sendo esse limite de tempo 24 horas e a partir do qual o efeito antitumoral verificado é sensivelmente o mesmo. Mais, o composto **T1** demonstrou ser já bastante eficaz com apenas uma hora de incubação. Por seu lado, o período de incubação das células com o complexo **B2** parece influenciar de um modo algo irregular a actividade citotóxica do mesmo, dado que apresenta um valor de ordem semelhante para 3 dos 4 ensaios efectuados e um valor duas vezes superior para o período de incubação de 24 horas.

3.2 Quantificação de molibdénio intracelular

Após se analisar a actividade citotóxica dos compostos e a sua relação com o tempo de exposição das células aos complexos, decidiu-se avaliar a capacidade destes compostos entrarem na célula como um primeiro passo para se compreender o modo como conduzem à morte celular. Este estudo permitiria ainda avaliar a resposta das células após incubação com concentrações crescentes de composto. Para tal, foi quantificado o molibdénio intracelular através de ICP-MS. Os resultados obtidos, quer da quantificação de molibdénio quer da contagem de células para cada amostra, encontram-se na Tabela 4; a variação da quantidade intracelular de molibdénio em células incubadas com diferentes concentrações de complexo está apresentada na Figura 9.

Tabela 4 - Quantificação celular das amostras e respectiva quantidade de molibdénio (μg).

Amostra	[complexo] (μM)	Nº Células	Mo (μg)
Controlo	0	$1,57 \times 10^6$	0,020
T1	10	$4,60 \times 10^5$	0,175
	50	$2,10 \times 10^5$	0,310
	100	$2,20 \times 10^5$	0,355
B2	10	$5,10 \times 10^5$	0,075
	50	$3,20 \times 10^5$	0,200
	100	$1,70 \times 10^5$	0,245

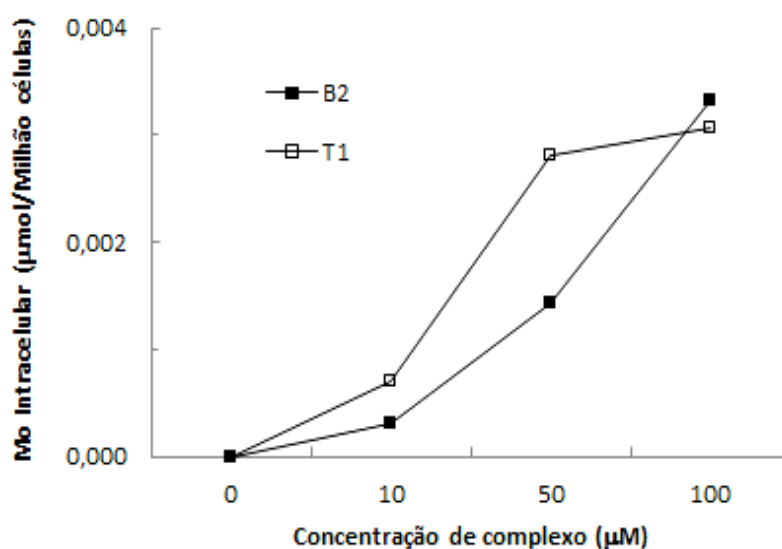


Figura 9 – Quantificação de molibdénio intracelular em células HeLa incubadas com diferentes concentrações dos complexos **B2** e **T1**.

Verificou-se que, quer para o complexo **T1** quer para o complexo **B2**, existe uma relação directamente proporcional entre a concentração de complexo que é incubada com a linha celular e a quantidade de molibdénio que é detectada na respectiva amostra. Contudo, existem diferenças entre eles: o composto **T1** parece entrar mais facilmente na célula a concentrações mais baixas em comparação com o composto **B2**, que por seu lado regista um maior aumento de entrada aquando da concentração mais elevada. Além disso, a quantidade celular de molibdénio que se detecta na concentração mais elevada, comparativamente ao controlo que representa a quantidade natural de molibdénio nas células, é aproximadamente 120 vezes maior. Isto mostra que pelo menos o metal dos complexos ou parte da molécula contendo molibdénio está a entrar na célula e que poderá ser isso que leva à morte celular, de acordo com os resultados dos estudos de citotoxicidade. Comparando com os resultados obtidos anteriormente com os compostos **B1** e **T2**, verifica-se que tanto o

composto **B2** como o composto **T1** entram tão facilmente na célula como o composto **B1**, estes três em oposição ao composto **T2**.^[26]

3.3 Estabilidade dos compostos em solução

Na sequência dos resultados anteriores, decidiu-se estudar a estabilidade dos compostos em solução aquosa (mantendo as condições dos ensaios anteriores, ou seja 0,5% de DMSO em água para possibilitar a dissolução dos compostos) de modo a aferir acerca da possibilidade deles se degradarem antes de entrarem na célula. Assim, foram analisadas soluções de ambos os complexos por espectrofotometria de absorção ao longo do tempo, para intervalos curtos de incubação (Figuras 10 e 11), e por espectroscopia de massa, após os diversos tempos de incubação utilizados nos estudos da cinética de citotoxicidade (ver Figuras 12 e 13 e em **Anexo** nas Figuras 22 a 29).

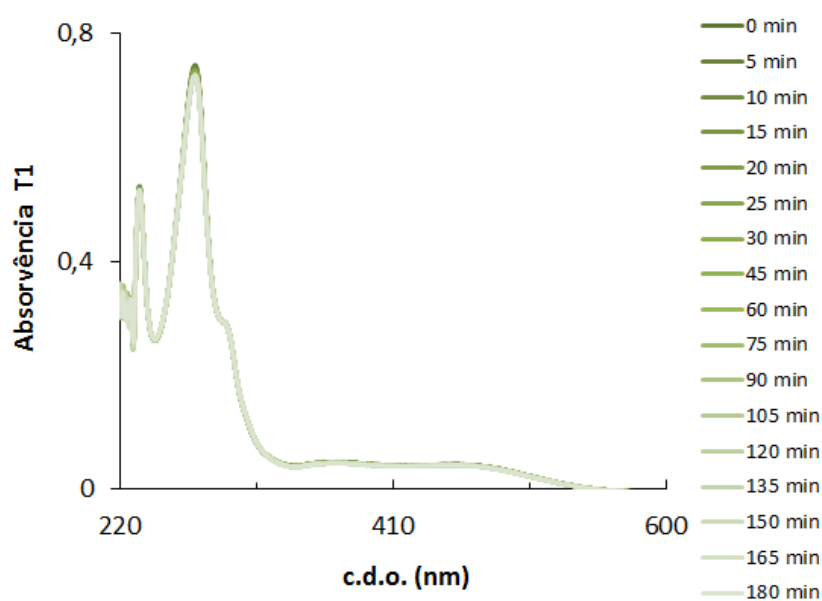


Figura 10 - Variação do espectro de absorção do complexo **T1**, em solução aquosa com 0,5% de DMSO, com o tempo de incubação da solução.

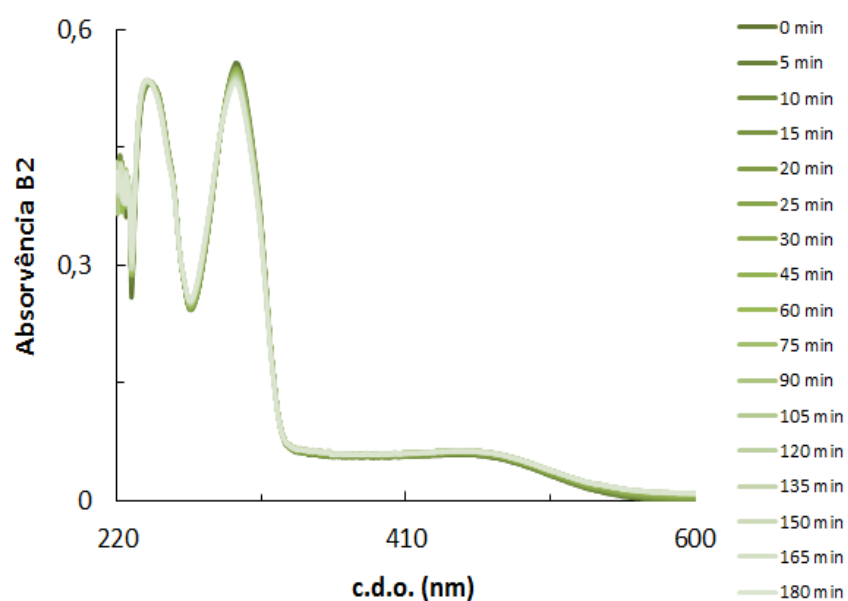


Figura 11 - Variação do espectro de absorção do complexo **B2**, em solução aquosa com 0,5% de DMSO, com o tempo de incubação da solução.

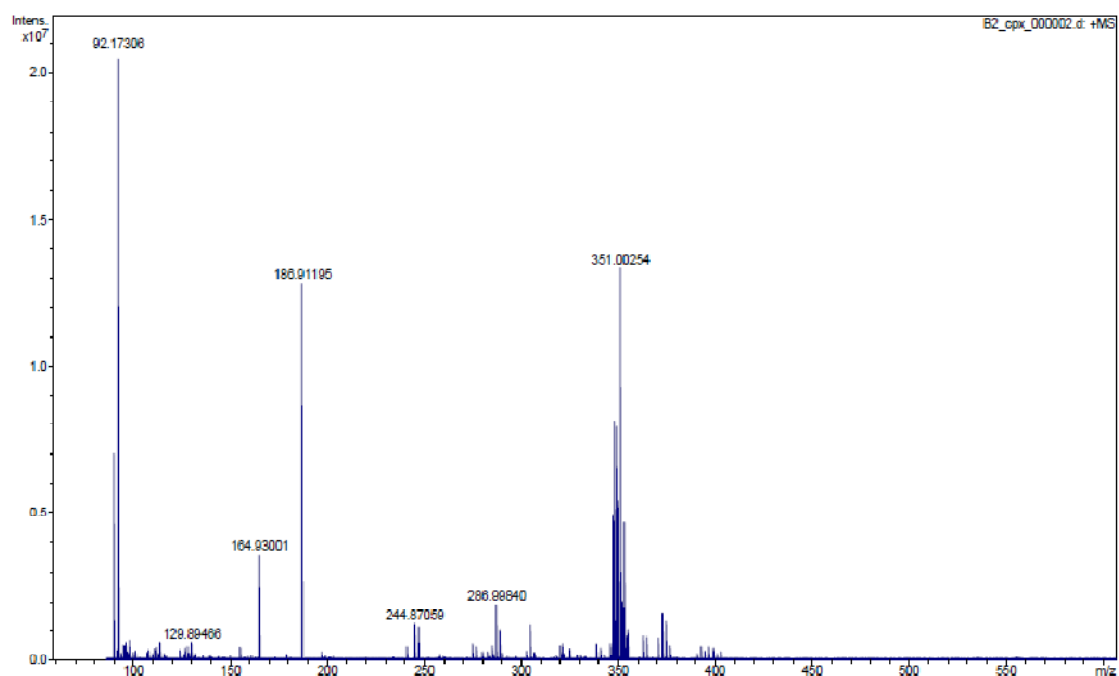


Figura 12 – Espectro de massa do composto **B2** sem incubação prévia.

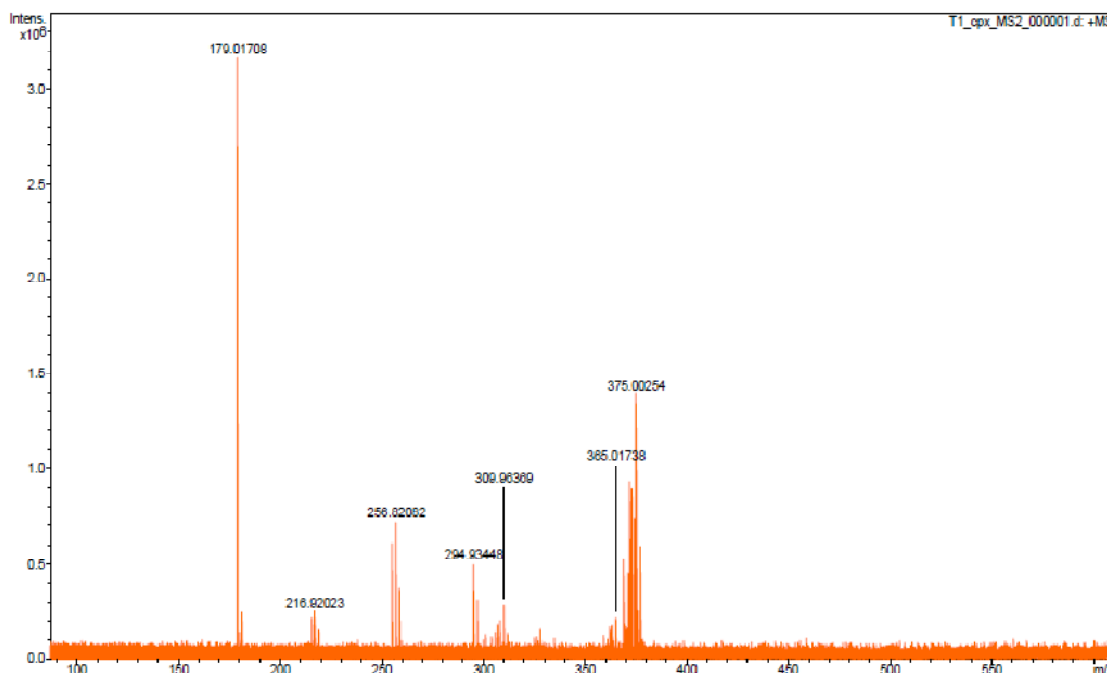


Figura 13 – Espectro de massa do composto **T1** sem incubação prévia.

Como se pode ver através do gradiente de cores do gráfico, do menor tempo de incubação (mais escuro) para o maior tempo (mais claro), a variação do espectro é mínima para ambos os compostos. Isto é indicativo de que os complexos aparentemente não sofrem modificações significativas em solução num período de tempo curto, o que poderá facilitar a análise e compreensão de resultados obtidos.

Os resultados obtidos pela espectrometria de massa permitem concluir que existe uma ligeira variação na composição da solução aquosa, com picos de outros possíveis compostos a surgirem no espectro. Os complexos originais permanecem como picos maioritários em quantidade relativa (os picos de $m/z = 196$ e 179 , nos espectros dos compostos **B2** e **T1** respectivamente, eram resultantes de contaminantes presentes no espectrómetro de massa, bem como os picos de m/z inferiores). O aparecimento dos restantes picos é resultante da perda de pequenos componentes do complexo, nomeadamente os grupos carbonilo (CO) e o grupo alilo (C_3H_5), bem como uma posterior oxidação do metal originando Mo - (ligando) - O_2 ainda que estas espécies não estejam em quantidade muito significativa. Assim, e analisando os resultados obtidos

por estes dois estudos, poder-se-á considerar que ambos os compostos são estáveis em solução durante o período de realização dos ensaios.

3.4 Condutividade

Para se poder determinar correctamente o coeficiente de partição octanol/água dos compostos, é necessário analisar a capacidade dos compostos conduzirem corrente eléctrica. Essa propriedade dos compostos deve-se ao facto de poderem formar em solução espécies iónicas solúveis em água. Foi então medido o valor da condutância de soluções aquosas dos compostos, por comparação com o solvente, e obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 14.

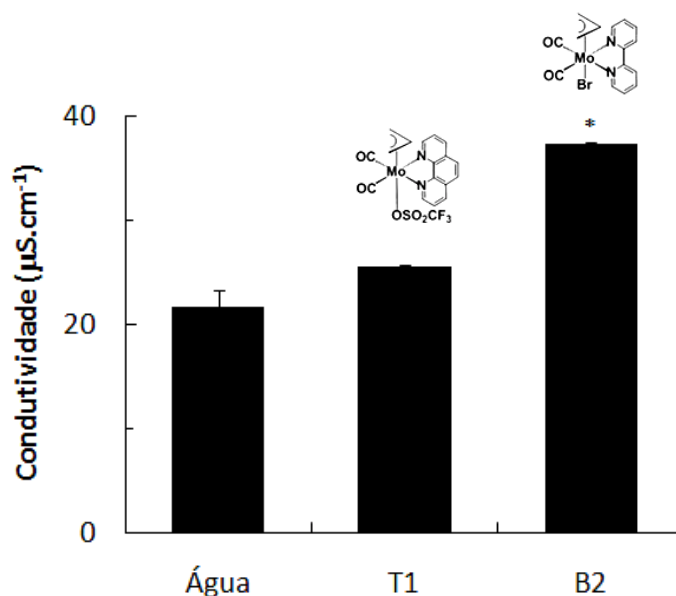


Figura 14 - Condutividade de soluções aquosas dos compostos **T1** e **B2** (* $p < 0.05$).

Como é possível observar no gráfico, o composto **T1** não apresenta uma variação relevante de condutância, comparativamente ao controlo, enquanto o composto **B2** mostra ter uma capacidade significativa para conduzir corrente. Isto significa que o composto **B2** tem maior tendência para formar espécies iónicas em solução que o

composto **T1**. Este resultado, contudo, é algo inesperado dado que o ligando iónico do composto **T1** (triflato) deveria ter mais tendência a libertar-se e a formar uma espécie iónica que o ligando aniónico do composto **B2** (brometo). O resultado deste ensaio afecta a análise do resultado que se obtém da determinação do coeficiente de partição octanol-água, dado que para se calcular esta característica de um composto de um modo exacto deve-se ter em atenção a possibilidade de o composto ter tendência ou não a formar espécies iónicas. Essas espécies iónicas influenciam a distribuição do respectivo complexo entre dois solventes de natureza diferente (base do ensaio de determinação do referido coeficiente), na medida em que se estaria a calcular um coeficiente de distribuição parcial ($\log D$) entre solventes em vez de um coeficiente de partição ($\log P$).

3.5 Determinação do coeficiente de partição octanol/água

Após o ensaio de condutividade, procedeu-se à determinação dos coeficientes de partição dos compostos, entre um solvente orgânico e um solvente aquoso. Estes dois solventes imiscíveis permitem simular de certo modo a interacção com a membrana biológica, tornando possível determinar as características hidrofóbicas/hidrofílicas dos compostos. Assim, foram analisadas as variações de absorvência nos respectivos picos máximos de absorvência (devidamente corrigidas) na fase orgânica de várias misturas de solventes com composto, antes e após um período de agitação. Utilizaram-se razões de volume bastante diferentes pelo facto dos compostos apenas se dissolverem no solvente orgânico (octanol), numa tentativa de forçar os mesmos a passar da fase para a fase aquosa, o que permitiria então verificar a sua hidrofilicidade. Consoante os valores de absorvência obtidos para cada um, foi calculado o coeficiente de partição de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Coef. Partição} = \log \left[\frac{Abs_{\text{pico de absorção}}^{\text{média final}}}{(Abs_{\text{pico de absorção}}^{\text{média inicial}} - Abs_{\text{pico de absorção}}^{\text{média final}})} \times \text{razão de volumes} \right]$$

É de referir ainda que compostos com coeficientes de partição positivos são considerados como hidrofóbicos (dado que permanecem na fase orgânica) e que coeficientes negativos são considerados como normalmente hidrofílicos. Após a execução dos vários ensaios independentes, obtiveram-se os valores de coeficientes de partição apresentados na Tabela 5. Os coeficientes médios, bem como os respectivos erros-padrão, encontram-se representados na Figura 15.

Tabela 5 - Coeficientes de partição octanol-água obtidos para os compostos **T1** e **B2**.

Composto	Coeficientes de partição obtidos					Média	Erro-padrão
B2	0,624	0,565	0,535	0,523	0,717	0,607	0,070
T1	1,196	0,909	0,125	1,306	0,480	0,803	0,496

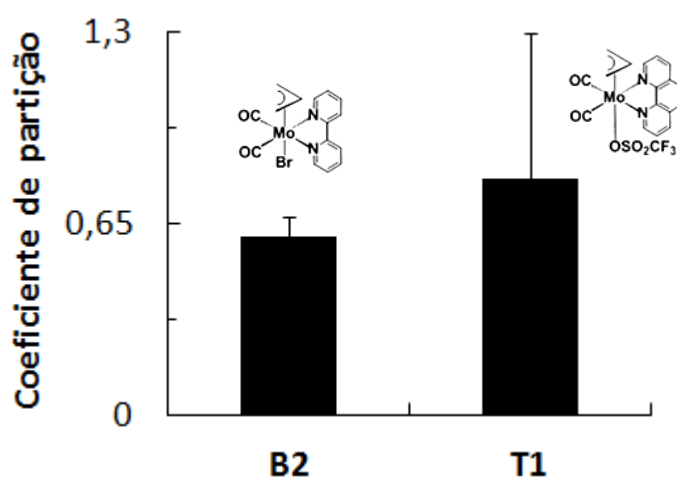


Figura 15 - Coeficientes de partição octanol-água dos compostos **B2** e **T1**.

Ambos os compostos têm características hidrofóbicas, dado que apresentam valores positivos para os coeficientes de partição. Verifica-se também que, ao contrário do que era esperado pelos estudos de condutividade, o composto **T1** apresenta resultados mais variáveis do que o composto **B2**; de acordo com esse estudo prévio, era previsto exactamente o oposto dado que os iões resultantes de **B2** se deveriam

dissolver na água. Contudo, este resultado vai de encontro ao que se verificou no ensaio de quantificação de molibdénio intracelular segundo o qual, para aproximadamente esta concentração, existe maior quantidade de molibdénio nas células após administração do composto **T1** do que do composto **B2**. De acordo com os coeficientes obtidos, o composto **B2** parece ser menos hidrofóbico do que o composto **T1**, o que ajudaria a explicar a sua aparente menor quantidade intracelular; contudo, o valor do coeficiente calculado para o complexo **T1** não pode ser considerado como conclusivo dado o elevado erro a ele associado.

3.6 Extracção e análise de DNA plasmídico por electroforese

Os complexos mostraram ter capacidade de entrar na célula, atravessando a membrana celular. Tornou-se assim interessante analisar uma possível interacção dos compostos com o DNA, uma vez que se verificou que os compostos parecem entrar na célula e assim podem vir a entrar também no núcleo. DNA intacto do plasmídeo pYES2 (5,9 kb) foi incubado com concentrações crescentes (10, 50 e 100 μM) dos dois complexos e foi analisado por electroforese em gel de agarose. Obtiveram-se os resultados apresentados nas Figuras 16 e 17.

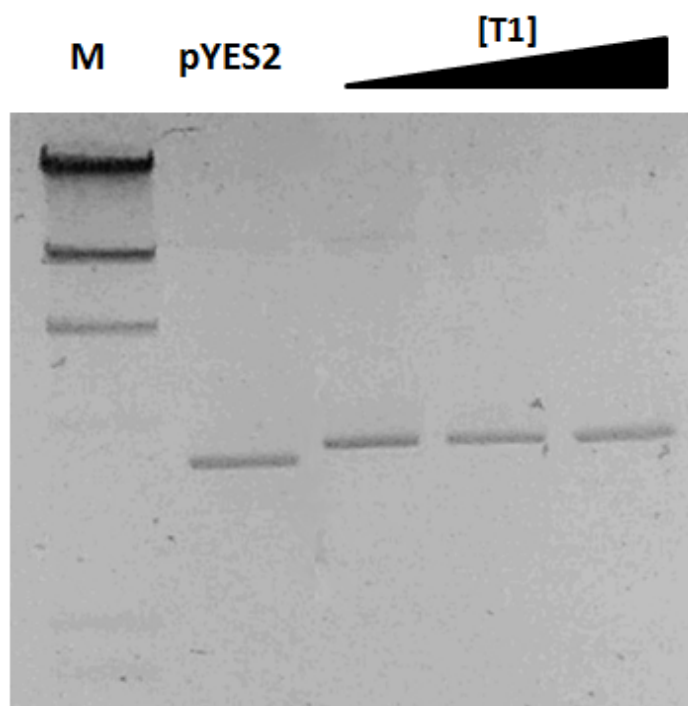


Figura 16 - Gel de agarose (1 % m/V) com amostras do plasmídeo **pYES2** incubado com diferentes concentrações do composto **T1** (10, 50 e 100 mM); **M** corresponde aos marcadores.

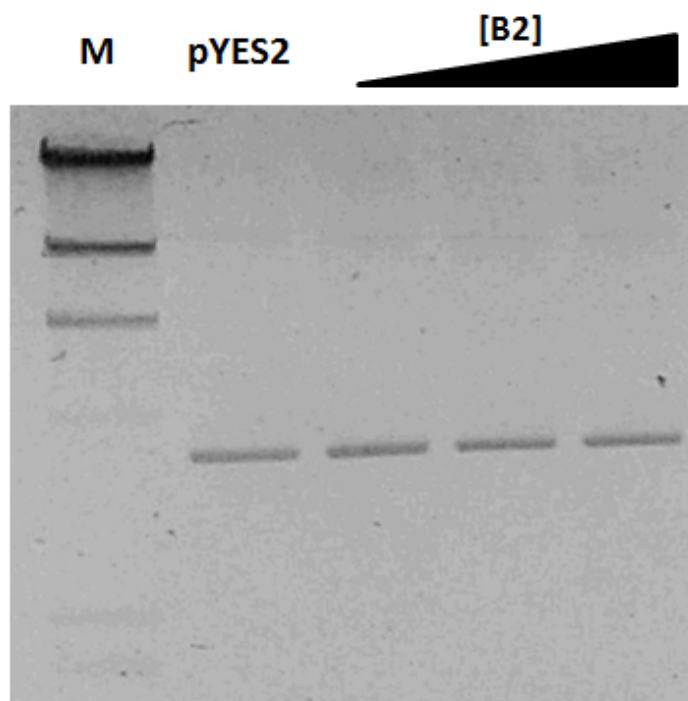


Figura 17 - Gel de agarose (1 % m/V) com amostras do plasmídeo **pYES2** incubado com diferentes concentrações do composto **B2** (10, 50 e 100 mM); **M** corresponde aos marcadores.

Embora nas imagens seja apenas visível a banda do plasmídeo correspondente ao DNA na sua forma superenrolada, observa-se que existem diferenças na migração das amostras de DNA incubado com composto e a que contém apenas o DNA plasmídico, bem como entre as várias concentrações analisadas. Para ambos os compostos, a sua incubação com o DNA fez com que este migrasse menos e que essa diferença de migração fosse mais evidente com o aumento de concentração de composto. Verifica-se ainda que a diferença na migração do plasmídeo é maior para as amostras com o complexo **T1** do que para as amostras com o complexo **B2**. Estas alterações na distância de migração da banda do DNA indicam que o DNA terá sofrido alguma modificação estrutural, induzida pelos compostos em estudo.

3.7 Titulação de DNA por Absorção

Para melhor analisar as possíveis interacções entre os complexos em estudo e DNA, analisou-se *in vitro* a variação do espectro de absorção dos compostos com adição de DNA de esperma de salmão. Tal como já foi referido nos **Materiais e Métodos**, o aumento da concentração do DNA na célula do ensaio foi anulado no espectro a observar, ao adicionar-se a mesma quantidade de DNA à célula de controlo. Esperava-se que os resultados obtidos através deste estudo *in vitro* pudessem ajudar a confirmar as alterações estruturais na estrutura do DNA que causaram as diferenças de migração de bandas do DNA plasmídico nos ensaios com os géis de agarose. As alterações obtidas nos espectros dos compostos B2 e T1 são as representadas nas Figuras 18 e 19 respectivamente.

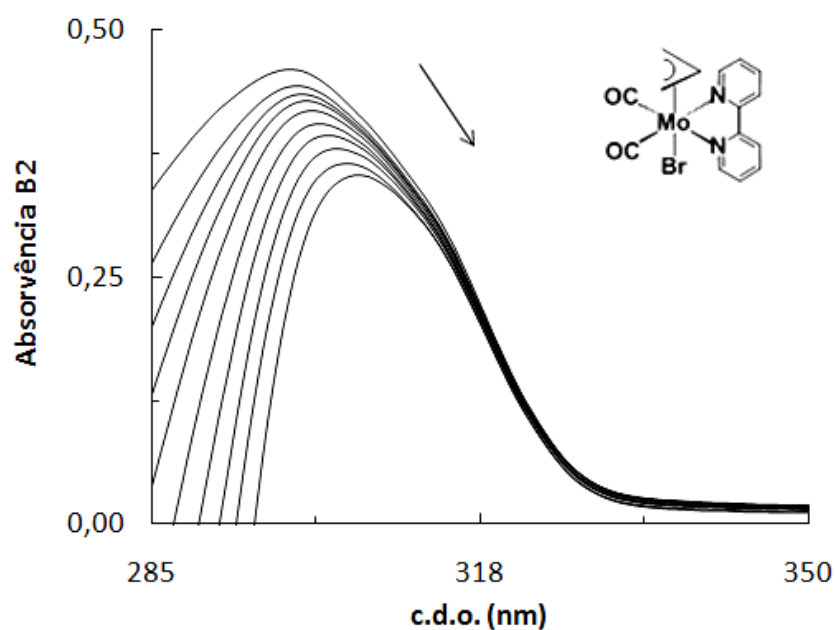


Figura 18 – Variação da absorvência do composto **B2**, indicado de acordo com a seta, a 299 nm (pico máximo de absorção) com o aumento da concentração de DNA no ensaio.

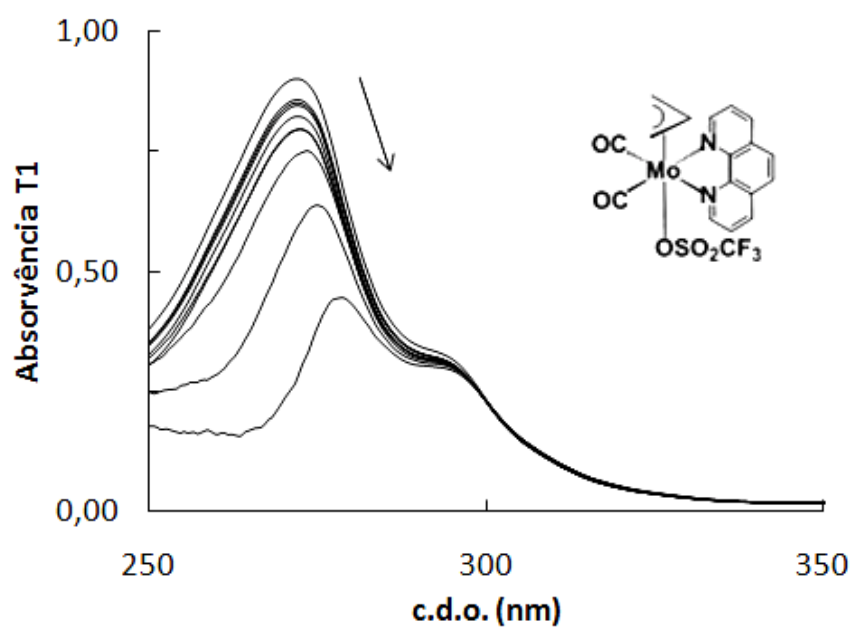


Figura 19 – Variação do espectro do composto **T1**, indicado de acordo com a seta, a 272 nm (pico máximo de absorção) com o aumento da concentração de DNA no ensaio.

Como se verifica pela análise dos espectros obtidos para os dois complexos, existe não só um abaixamento do espectro (hipocromismo) como também um desvio do pico máximo para a região do vermelho (batocromismo). Estas variações são fortes indicativos de que estes compostos têm a intercalação como principal modo de interacção com o DNA.^[41] Estes resultados vão de encontro aos obtidos através dos géis de agarose, uma vez que a intercalação dos compostos no DNA plasmídico modificaria a sua estrutura levando assim a que ele migrasse menos. Para avaliar melhor a interacção destes complexos com o DNA, calcularam-se as respectivas constantes de ligação ao DNA através da seguinte fórmula,

$$\frac{[DNA]}{\Delta\epsilon_{ap}} = \frac{[DNA]}{\Delta\epsilon} + \frac{1}{\Delta\epsilon \times K_b}$$

onde a concentração de DNA é expressa em pares de bases, $\Delta\epsilon_{ap} = |\epsilon_A - \epsilon_F|$, $\epsilon_A = A_{obs}/[complexo]$, e $\Delta\epsilon = |\epsilon_B - \epsilon_F|$, com ϵ_B e ϵ_F a corresponderem aos coeficientes de extinção do complexo ligado ao DNA e do complexo livre, respectivamente. Todos os coeficientes de extinção molar acima referidos são relativos ao pico de absorção máximo de cada composto, 299 nm para o composto **B2** e 272 nm para o composto **T1**. Os coeficientes de extinção dos compostos no estado livre foram calculados logo no início do ensaio tendo sido obtidos, através da variação da absorvência no pico máximo de absorção de cada composto em relação à sua concentração (ver **Anexos**, Figura 31), os valores de $51827 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o complexo **T1** e de $22899 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o complexo **B2**. Através desta fórmula, foi possível traçar uma recta em que a razão de valores do declive sobre a ordenada na origem irá corresponder à constante de ligação ao DNA, sendo um exemplo desta recta apresentado na Figura 20. Os valores das constantes resultantes dos três ensaios independentes, a constante de ligação de cada composto e o respectivo erro-padrão encontram-se esquematizados na Tabela 6 e, para uma análise mais directa, representados no gráfico da Figura 21. Quer na tabela quer no gráfico

adicionaram-se para comparação os valores apresentados na literatura para o brometo de etídio (BrEt) dado que este é um intercalador clássico de DNA.^[42]

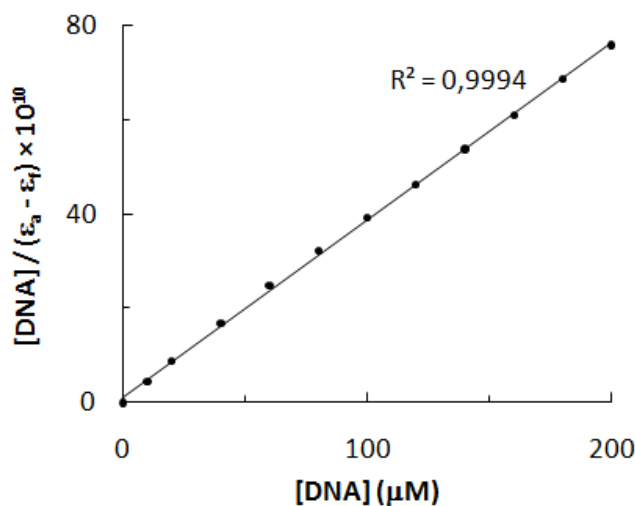


Figura 20 – Recta obtida em função das medidas de absorvência no pico máximo de absorção de cada composto para várias concentrações de DNA.

Tabela 6 – Valores obtidos para constantes de ligação ao DNA para os compostos **T1** e **B2** e valor tabelado na literatura para o **BrEt**.^[42]

Composto	Constantes de ligação obtidas ($\times 10^5$)			Média ($\times 10^5$)	Erro-padrão($\times 10^5$)
T1	4,45	5,65	2,97	4,36	1,34
B2	1,93	2,79	2,23	2,32	0,44
BrEt	-----	-----	-----	1,23	0,07

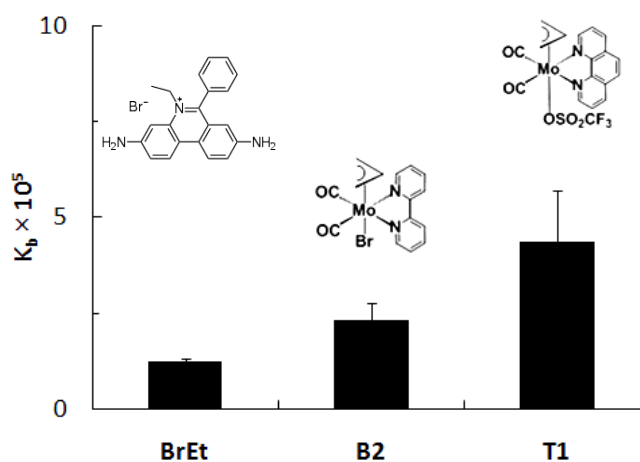


Figura 21 – Gráfico comparativo das constantes de ligação dos compostos **B2**, **T1** e do **BrEt**.^[42]

Como é possível concluir através dos valores obtidos, as constantes de ligação dos compostos **T1** e **B2** são da mesma ordem de grandeza da constante do **BrEt**, mas mais elevadas. Estes valores, juntamente com as alterações verificadas nos respectivos espectros de absorção aquando do aumento da concentração de DNA (hipocromismo e batocromismo), permitem concluir que tanto o composto **T1** como o composto **B2** são agentes intercaladores do DNA. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos nos géis de agarose, que sugerem que os compostos poderão ter-se intercalado no DNA plasmídico e assim retardado a sua migração no gel.

4. CONCLUSÕES

Os compostos **T1** e **B2** (Figura 5) demonstraram ser muito interessantes do ponto de vista biológico e promissores do ponto de vista medicinal. Ambos apresentaram uma excelente actividade citotóxica com IC_{50} bastante baixos, com **T1** a apresentar valores entre 1 e 4 μM e com **B2** entre 4 e 23 μM . A determinação de citotoxicidade dos ligandos isolados mostrou que a sua coordenação a molibdénio em complexos potencia significativamente o seu efeito antitumoral. É também interessante o facto dos compostos mostrarem alguma selectividade relativamente às linhas celulares testadas, ambos apresentando menor toxicidade (valores de IC_{50} superiores) para a linha celular RPE, a mais próxima do modelo de uma linha celular normal, quando comparados com as restantes linhas celulares. Outras linhas celulares não tumorais deveriam ser testadas para confirmar este dado potencialmente importante, dado que permitiria a utilização destes compostos como agentes quimioterapêuticos de um modo controlado e sem um elevado risco para o organismo. Por fim, comparando com a citotoxicidade dos compostos **B1** e **T2** estudados anteriormente (Tabela 7) verifica-se que o ligando neutro **L1** é o que atribui maior citotoxicidade ao composto a que está acoplado, quando comparado com os compostos que têm o ligando neutro **L2**.^[26]

Tabela 7 – Valores de IC_{50} (μM) obtidos nos ensaios de citotoxicidade para as diversas linhas celulares para os ligandos **L1** e **L2**, os compostos **B2** e **T1**, e para os compostos **B1** e **T2** (retirado de [26]).

IC_{50} (μM)	HeLa	MCF-7	RPE
L1	25,4	-	-
L2	n.d.	-	-
B1	5,1	8,9	-
B2	3,62	7,92	23,30
T1	0,65	0,66	4,34
T2	23,7	44,5	-

Os estudos de cinética de incubação dos compostos revelaram que o composto **T1** tem uma acção imediata na linha celular e que ao fim de 24 horas atinge um máximo de citotoxicidade, pelo que o tempo adequado de incubação deste composto com a

linha celular deve ser 24 horas para um maior efeito. Já para o composto **B2**, não existe uma grande variação entre os diferentes tempos de incubação estudados.

Os estudos de quantificação de molibdénio intracelular revelaram que os compostos têm uma certa facilidade em entrar na célula, dado que em ambos os casos a concentração de molibdénio intracelular aumenta consideravelmente com a concentração de complexo a que as linhas celulares são sujeitas.

Quanto à sua estabilidade, os compostos mostraram quer por espectroscopia de absorção quer por espectrometria de massa que são estáveis em solução aquosa mesmo após 48 horas de incubação, pelo que em princípio estarão maioritariamente na sua forma original dentro da célula.

Nos estudos de condutividade e de determinação do coeficiente de partição octanol-água, foi mostrado que o composto **T1** não apresentava condutividade mas que no entanto não foi possível obter um coeficiente de partição que se considere verdadeiramente conclusivo ($\log P = 0,803 \pm 0,496$) devido ao erro associado à sua enorme variabilidade. Esta variabilidade era esperada pela presença do ligando iónico triflato na sua constituição embora não fosse prevista de acordo com os resultados do ensaio de condutividade, resultados esses que se tornam assim duvidosos. O resultado do ensaio de análise da condutividade do composto **B2** também não correspondeu ao que se veio a verificar na determinação do seu coeficiente de partição. Neste caso, o composto mostrou estabilidade nos últimos ensaios e resultados e obteve-se um valor positivo ($\log P = 0,607 \pm 0,070$), tal como para o **T1**; contudo, a sua aparente condutividade eléctrica apontava no sentido de que o resultado fosse mais variável. Assim, conclui-se que ambos os compostos têm um carácter hidrofóbico, o que facilita a sua passagem por uma membrana celular e a sua entrada na célula. Quanto ao estudo de condutividade, deverá ser repetido para confirmar ou desmentir os resultados obtidos. Por fim, e por comparação com resultados anteriores para os compostos da mesma família, verifica-se que os compostos contendo o triflato têm uma nítida tendência para dar origem a valores inconclusivos, provavelmente devido ao facto de formarem espécies iónicas com mais facilidade (algo a confirmar com novo ensaio de

condutividade), enquanto que os compostos com brometo como ligando aniónico demonstraram ser mais estáveis.^[26]

No estudo da migração do DNA plasmídico numa electroforese em agarose após incubação com os compostos, verificou-se que existia uma diminuição de migração provocada por ambos os compostos. O maior retardamento das bandas de DNA plasmídico esteve relacionado positivamente com o aumento da concentração de composto incubado com o DNA. Concluiu-se assim que o composto interage com o DNA e que essa interacção leva a modificações na sua estrutura alterando assim a sua migração num gel de agarose.

Por fim, através dos ensaios de titulação de DNA foi possível observar que o espectro dos compostos sofre hipocromismo e batocromismo com o aumento da concentração de DNA. Com estas alterações, conclui-se que os compostos interagem com o DNA principalmente por intercalação. Calcularam-se ainda os valores das constantes de ligação ao DNA, tendo-se obtido valores elevados tanto para **T1** ($4,36 \times 10^5 \pm 1,34 \times 10^5$) como para **B2** ($2,32 \times 10^5 \pm 0,44 \times 10^5$), estando ambos na mesma ordem de grandeza do intercalador clássico **BrEt** ($1,23 \times 10^5 \pm 0,07 \times 10^5$). Por comparação com os compostos da mesma família previamente estudados (**B1** = $3,68 \times 10^5 \pm 2,01 \times 10^5$; **T2** = $2,08 \times 10^5 \pm 0,98 \times 10^5$) verifica-se que os compostos com o ligando neutro **L1** possuem constantes de ligação mais elevadas que os compostos que contêm na sua estrutura o ligando **L2**.^[26] Como tal, não se podendo excluir outros modos de interacção, conclui-se que um composto com o ligando **L1** terá uma maior tendência a interagir com o DNA por intercalação que um composto contendo o ligando **L2**.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento destes promissores compostos deverá ser aprofundado no futuro, de modo a compreender melhor o seu mecanismo de acção sobre as células. Existem alguns estudos que dariam informação relevante nesse sentido, sendo a maioria deles já aplicada neste campo científico para os mesmos fins. Um dos ensaios seria a análise do espectro de elipticidade dos compostos através de dicroísmo circular. Este ensaio poderia dar uma informação mais pormenorizada do modo como estes compostos interagem com o DNA, verificando-se alterações na elipticidade deste após incubação com os compostos.^[43] Outro ensaio que se poderia fazer igualmente seria estudar o efeito destes compostos na estrutura terciária do DNA através de microscopia de força atómica. Este ensaio permite visualizar directamente as modificações que ocorrem no enrolamento do DNA após a incubação com os compostos, o que complementaria os resultados já obtidos.^[44] Poder-se-ia ainda fazer um outro ensaio para avaliar o modo como se dá a morte celular por acção dos complexos, por citometria de fluxo. Assim, seria possível verificar se as células morriam por apoptose ou por necrose, podendo-se inferir acerca dos processos envolvidos na morte celular por acção dos compostos estudados.^[45] Mais um estudo que seria interessante efectuar para compreender melhor a acção deste tipo de compostos e os mecanismos em que estão inseridos envolve microscopia de fluorescência. Para tal, acoplar-se ia um ligando fluorescente ao complexo de modo a que se pudesse acompanhar a sua presença nos compartimentos celulares, eventualmente no núcleo.^[46]

6. REFERÊNCIAS

- [01] C. Socaciu, I. Pasca, C. Silvestru, A. Bara, I. Haiduc; *"Antitumor organometallics. IV. The mutagenic potential of some diphenylantimony(III) dithiophosphorus derivatives"*; Metal Based Drugs **1**(4) (1994) 291–297.
- [02] C.G. Hartinger, B.K. Keppler; *"CE in anticancer metallodrug research – an update"*; Electrophoresis **28** (2007) 3436–3446.
- [03] J. Luo, N.L. Solimini, S.J. Elledge; *"Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction"*; Cell **136** (2009) 823–837.
- [04] D. Hanahan, R.A. Weinberg; *"The hallmarks of cancer"*; Cell **100** (2000) 57–70.
- [05] Y-P. Ho, S.C.F. Au-Yeung, K.K.W. To; *"Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives"*; Medicinal Research Reviews **23**(5) (2003) 633–655.
- [06] J-P. Gillet, M.M. Gottesman; *"Mechanisms of multidrug resistance in cancer"*; Methods in Molecular Biology **596** (2010) 47–76.
- [07] B.A. Chabner, T.G. Roberts Jr; *"Timeline: Chemotherapy and the war on cancer"*; Nature Reviews **5** (2005) 65–72.
- [08] V. Diehl; *"Advanced Hodgkin's Disease: ABVD is better, yet is not good enough!"*; Journal of Clinical Oncology **21**(4) (2003) 583–585.
- [09] S.J. Kellie, P. Koopmans, J. Earl, C. Nath, D. Roebuck, D.R.A. Uges, S.S.N. de Graaf; *"Increasing the Dosage of Vincristine"*; Cancer **100**(12) (2004) 2637–2643.
- [10] A. Alama, B. Tasso, F. Novelli, F. Sparatore; *"Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents"*; Drug Discovery Today **14**(9/10) (2009) 500–508.
- [11] D.D. Von Hoff; *"There Are No Bad Anticancer Agents, Only Bad Clinical Trial Designs-Twenty-first Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture"*; Clinical Cancer Research **4** (1998) 1079–1086.
- [12] T. Mosmann; *"Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays"*; Journal of Immunological Methods **65** (1983) 55–63.

- [13] S. Kawanishi, Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa; *"The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis"*; Free Radical Biology & Medicine **23**(9) (2002) 822-832.
- [14] J.A. McKnight; *"Principles of Chemotherapy"*; Clinical Techniques in Small Animals Practice **18**(2) (2003) 67-72.
- [15] D.S. Riddick, C. Lee, S. Ramji, E.C. Chinje, R.L. Cowen, K.J. Williams, A.V. Patterson, I.J. Stratford, C.S. Morrow, A.J. Townsend, Y. Jounaidi, C. Chen, T. Su, H. Lu, P.S. Schwartz, D.J. Waxman; *"Cancer chemotherapy and drug metabolism"*; Drug Metabolism and Disposition **33**(8) (2005) 1083-1096.
- [16] P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, W. Berger; *"Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities"*; Drug Resistance Updates **11** (2008) 1-16.
- [17] A.L. Harris, D. Hochhauser; *"Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment"*; Acta Oncologica **31**(2) (1992) 205-213.
- [18] D.J. Stewart; *"Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin"*; Critical Reviews in Oncology/Hematology **63** (2007) 12-31.
- [19] D. Chen, V. Milacic, M. Frezza, Q. Ping Dou; *"Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy"*; Current Pharmaceutical Design **15** (2009) 777-791.
- [20] C. Orvig, M.J. Abrams; *"Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction"*; Chemical Reviews **99**(9) (1999) 777-791.
- [21] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sandler; *"Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes"*; Chemical Communications **38** (2005) 4764-4776.
- [22] A.F.A. Peacock, P.J. Sandler; *"Medicinal Organometallic Chemistry: Designing Metal Arene Complexes as Anticancer Agents"*; Asian Journal of Chemistry **3** (2008) 1890-1899.
- [23] H. Köpf, P. Köpf-Maier; *"Titanocene dichloride—the first metallocene with cancerostatic activity"*; Angewandte Chemie International Edition **18**(6) (1979) 477-478.
- [24] H. Fujita, T. Fugita, T. Sakurai, T. Yamase, Y. Seto; *"Antitumor Activity of New Antitumor Substance, Polyoxomolybdate, against Several Human Cancers in Athymic Nude Mice"*; The Tohoku journal of experimental medicine **168** (1992) 421-426.

- [25] M.R. Matos, C.C. Romão, C.L. Pereira, S.S. Rodrigues, M. Mora, M.P. Silva, P.M. Alves, C.A. Reis; **Patent WO/2005/087783** (2005).
- [26] D. Bandarra, M. Lopes, T. Lopes, J. Almeida, M.S. Saraiva, M. Vasconcellos-Dias, C.D. Nunes, V. Félix, P. Brandão, P.D. Vaz, M. Meireles, M.J. Calhorda; *"Mo(II) complexes: A new family of cytotoxic agents?"*; Journal of Inorganic Biochemistry **104** (2010) 1171-1177.
- [27] A.M. Pizarro, P.J. Sadler; *"Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes"* Biochimie **91** (2009) 1198-1211.
- [28] R. Huang, A. Wallqvist, D.G. Covell; *"Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action"* Biochemical Pharmacology **69** (2005) 1009-1039.
- [29] E.C. Long, J.K. Barton; *"On demonstrating DNA intercalation"* Accounts of Chemical Research **23**(9) (1990) 271-273.
- [30] M.S. Rocha; *"Revisiting the Neighbor Exclusion Model and Its Applications"* Biopolymers **93**(1) (2009) 1-7.
- [31] P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler; *"New trends for metal complexes with anticancer activity"* Current Opinion on Chemical Biology **12** (2008) 197-206.
- [32] T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio; *"A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action"* Dalton Transactions (2009) 7588-7598.
- [33] R.S. Kumar, S. Arunachalam, V.S. Periasamy, C.P. Preethy, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha; *"DNA binding and biological studies of some novel water soluble polymer copper(II) phenanthroline complexes"* European Journal of Medicinal Chemistry (2008) 2082-2091.
- [34] M. Nugoli, J. Vendrell, B. Orsetti, L. Ursule, C. Nguyen, D. Birnbaum, E. Douzery, P. Cohen, C. Theillet; *"Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications"*; BMC Cancer **3**(13) (2003) 1-12.
- [35] R. Lukyanova, A. Tregubova, F. Chekhun; *"Molecular Profile and Cell Cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and doxorubicin"*; Experimental Oncology **31**(2) (2009) 87-91.
- [36] A.G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner, W.E. Wright; *"Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells"*; Science **279** (1998) 349-352.

- [37] A. McKeague; *"Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines"*; British Journal of Cancer **88** (2003) 125-131.
- [38] J.M. Kelly, M.J. Murphy, D.J. McConnell, C. Ohuigin; Nucleic Acids Res **13** (1985) 167-184.
- [39] H.S. Kaplan; *"Hodgkin's Disease: Biology, Treatment, Prognosis"*; Blood **57**(5) (1981) 813-822.
- [40] D.L. Ma, C.M. Che; *"A bifunctional platinum(II) complex capable of intercalation and hydrogen-bonding interactions with DNA: binding studies and cytotoxicity"*; Chemistry – A European Journal **9** (2003) 6133-6144.
- [41] H. Wang, R. Shen, J. Wu, N. Tang; *"Antitumor Activity and DNA-Binding Investigations of the Zn(II) and Cu(II) complexes with isoeuxanthone"*; Chemical & Pharmaceutical Bulletin **57**(8) (2009) 814-818.
- [42] A. Dimitrakopoulou, C. Dendrinou-Samara, A.A. Pantazaki, M. Alexiou, E. Nordlander, D.P. Kessissoglou; *"Synthesis, structure and interactions with DNA of novel tetranuclear, [Mn₄(II/II/II/IV)] mixed valence complexes"*; Journal of Inorganic Biochemistry **102** (2008) 618-628.
- [43] X. Riera, V. Moreno, C.J. Ciudad, V. Noe, M. Font-Bardía, X. Solans; *"Complexes of Pd(II) and Pt(II) with 9-aminoacridine: reactions with DNA and study of their antiproliferative activity"*; Bioinorganic Chemistry & Applications **2007** (2007) 1-15.
- [44] L.H. Pope, M.C. Davies, C.A. Laughton, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, P.M. Williams; *"Atomic force microscopy studies of intercalation-induced changes in plasmid DNA tertiary structure"*; Journal of Microscopy **199** (2001) 68-78.
- [45] F. Belloc, P. Dumain, M.R. Boisseau, C. Jalloustre, J. Reiffers, P. Bernard, F. Lacombe; *"A flow cytometric method using Hoechst 33342 and Propidium Iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells"*; Cytometry **17** (1994) 59-65.
- [46] N. Yamamoto, S. Danos, P.D. Bonnitcho, T.W. Failes, E.J. New, T.W. Hambley; *"Cellular uptake and distribution of cobalt complexes of fluorescent ligands"*; Journal of Biological Inorganic Chemistry **13** (2008) 861-871.

7. ANEXOS

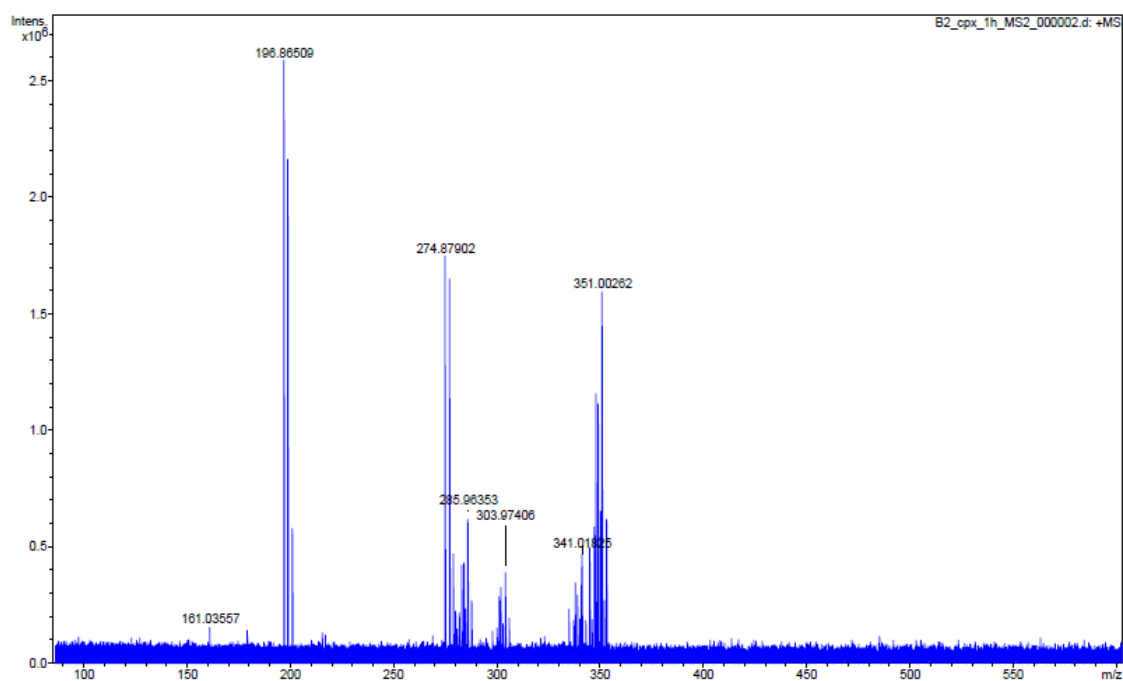


Figura 22 – Espectro de massa do composto B2 após 1 hora de incubação.

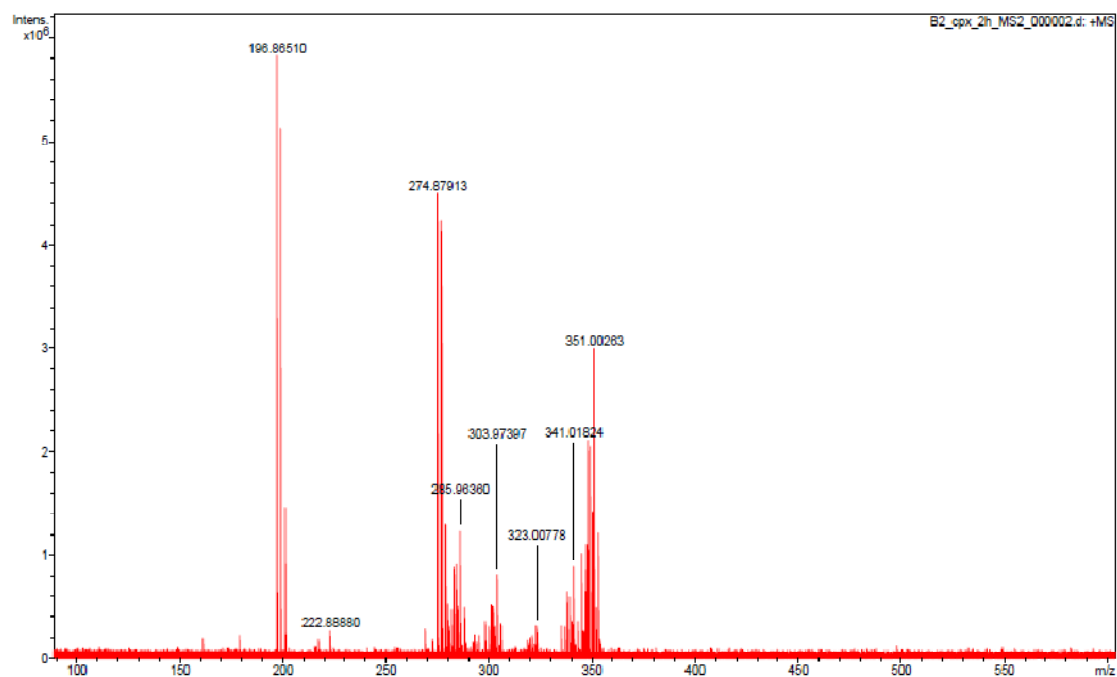


Figura 23 – Espectro de massa do composto B2 após 2 horas de incubação.

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÊNIO(II)

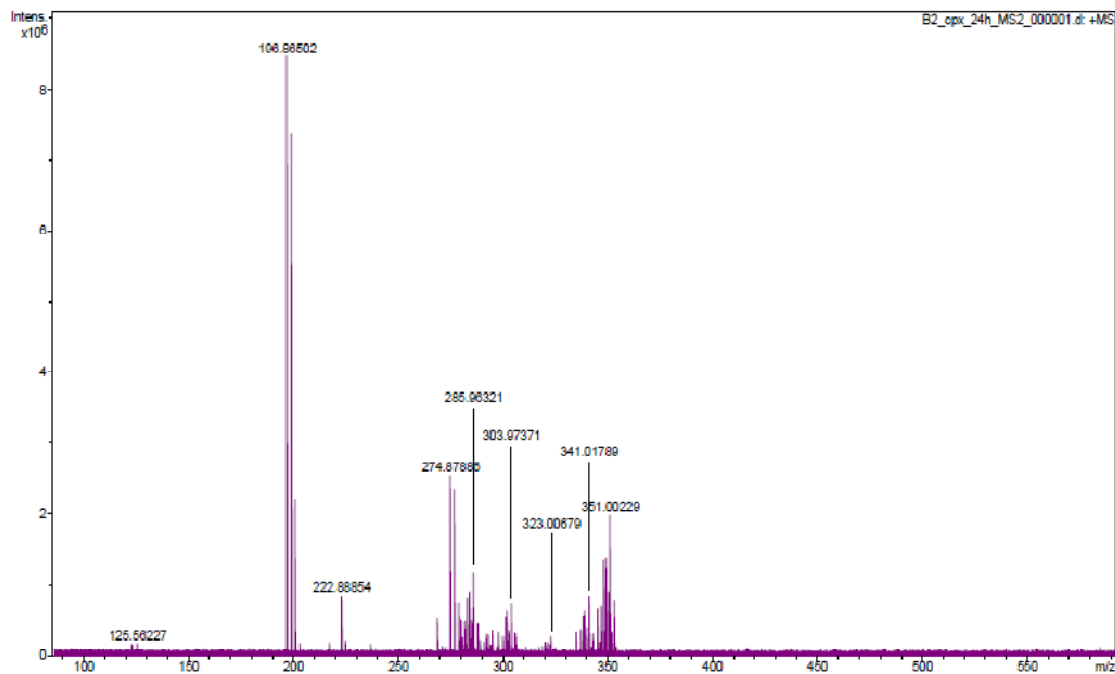


Figura 24 – Espectro de massa do composto **B2** após 24 horas de incubação.

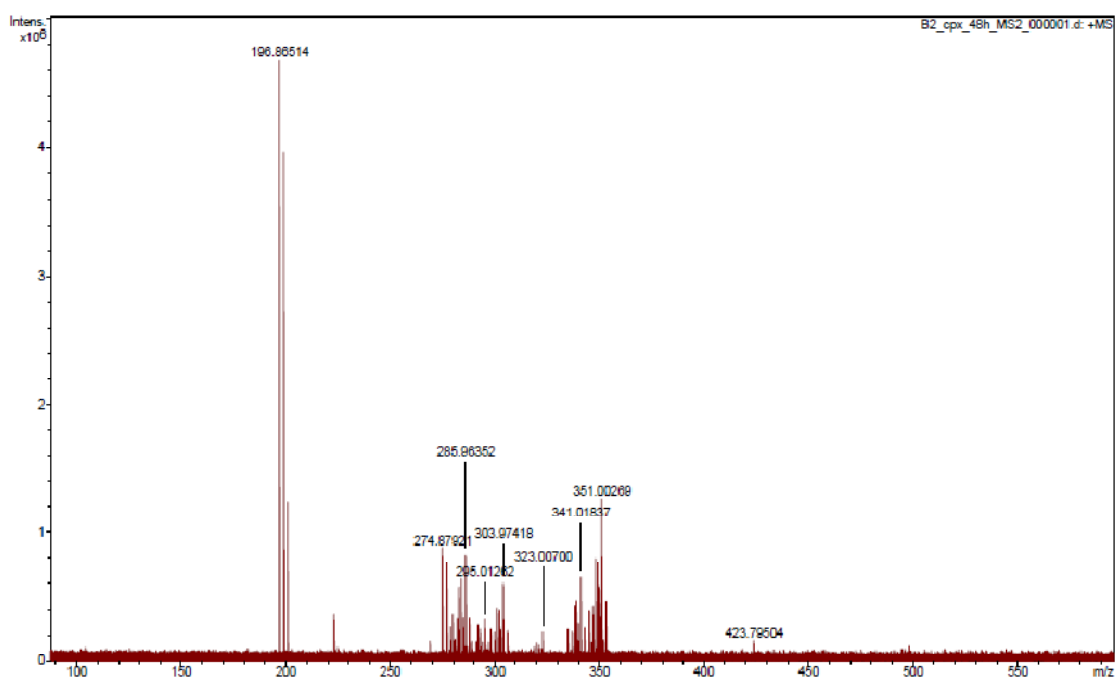


Figura 25 – Espectro de massa do composto **B2** após 48 horas de incubação.

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÊNIO(II)

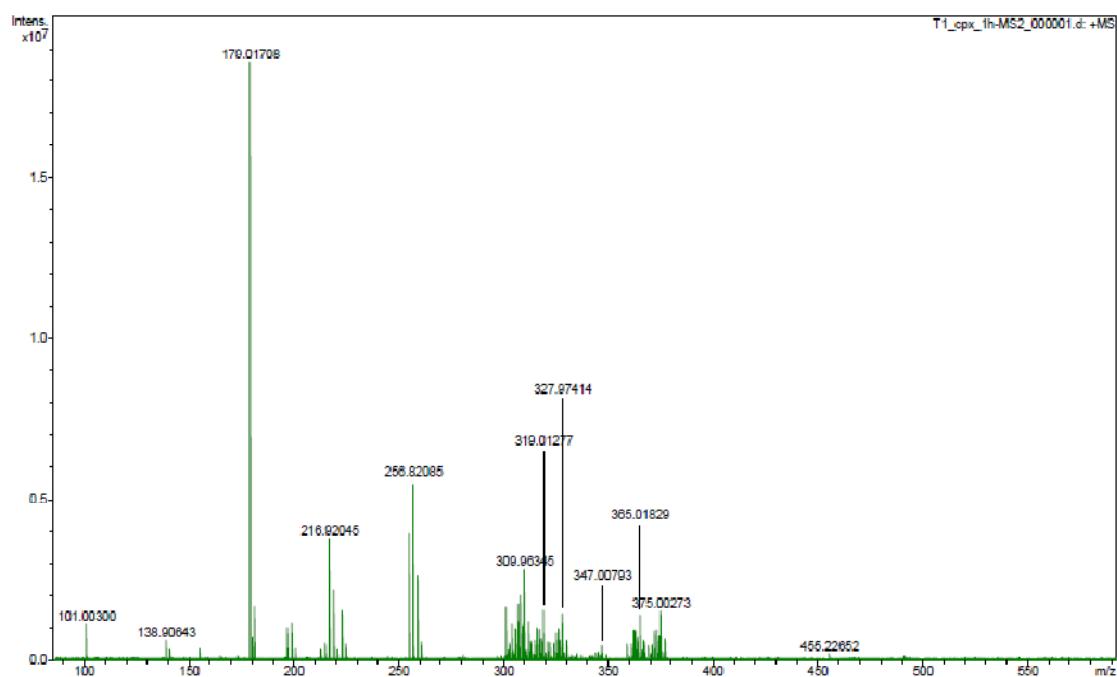


Figura 26 – Espectro de massa do composto **T1** após 1 hora de incubação.

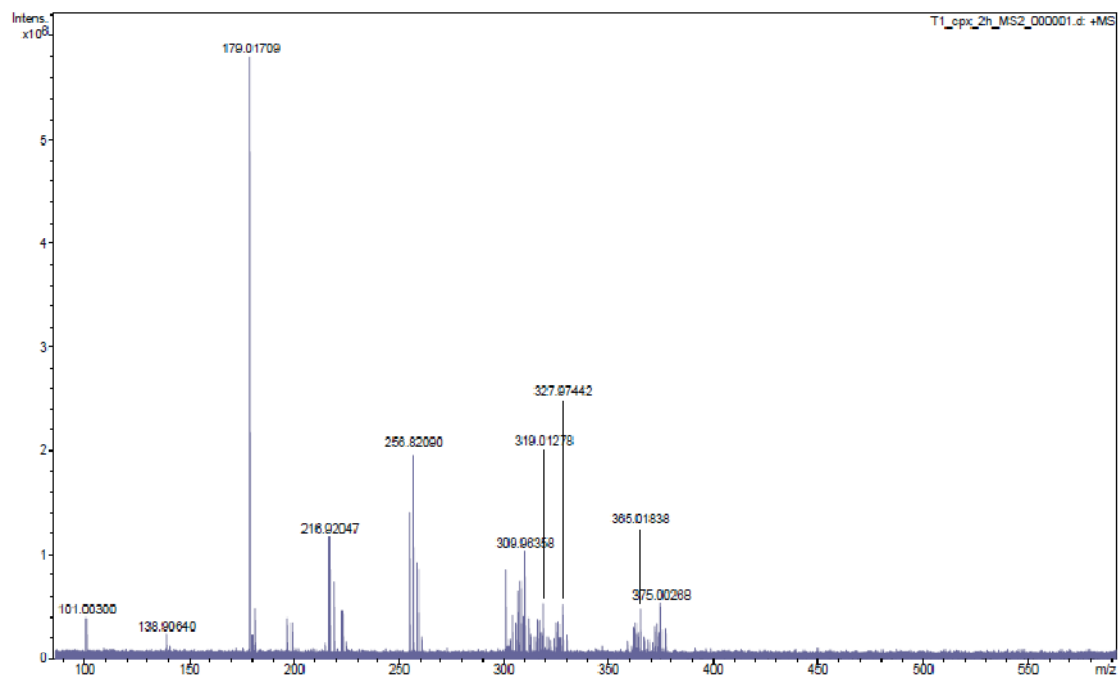


Figura 27 – Espectro de massa do composto **T1** após 2 horas de incubação.

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÊNIO(II)

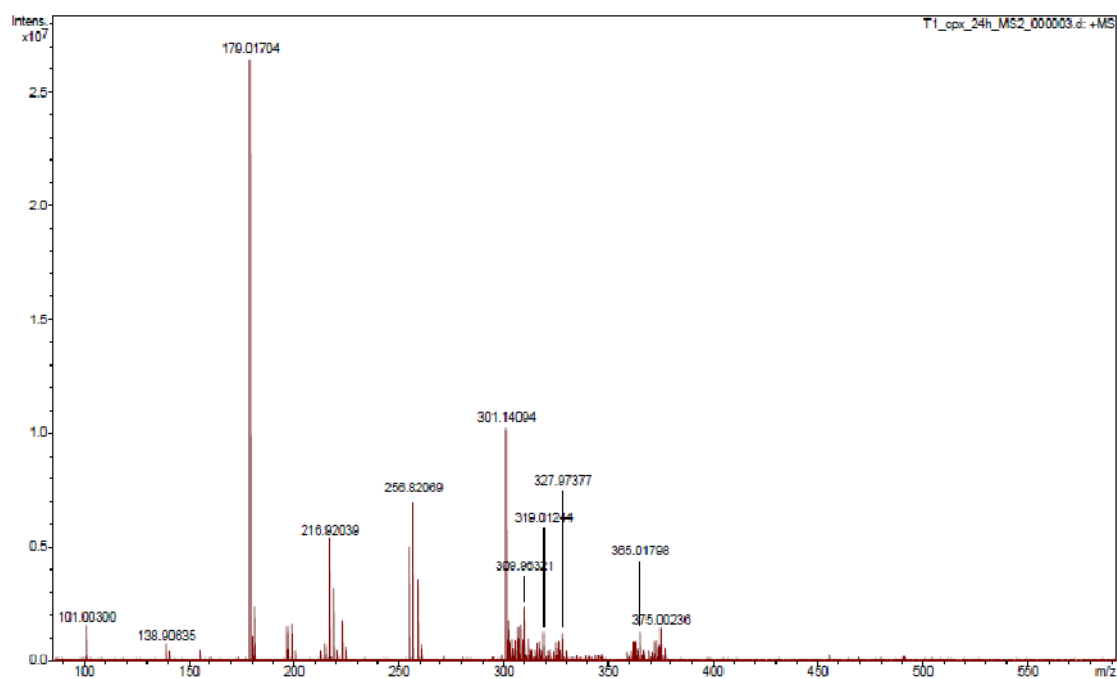


Figura 28 – Espectro de massa do composto **T1** após 24 horas de incubação.

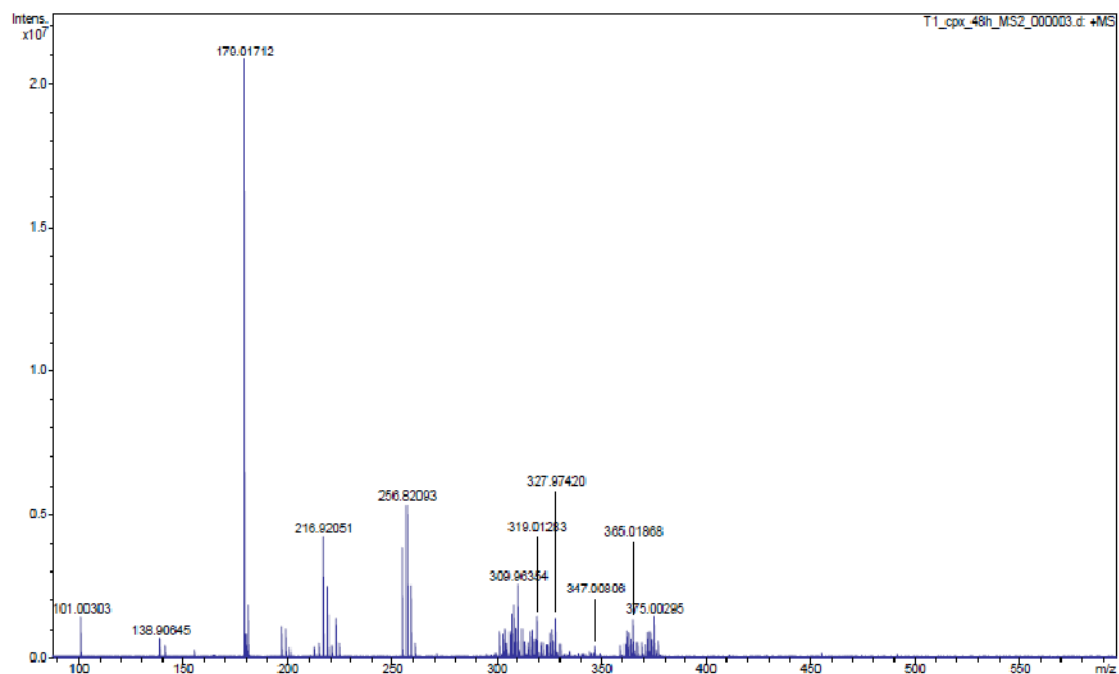


Figura 29 – Espectro de massa do composto **T1** após 48 horas de incubação.

ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE MOLIBDÉNIO(II)

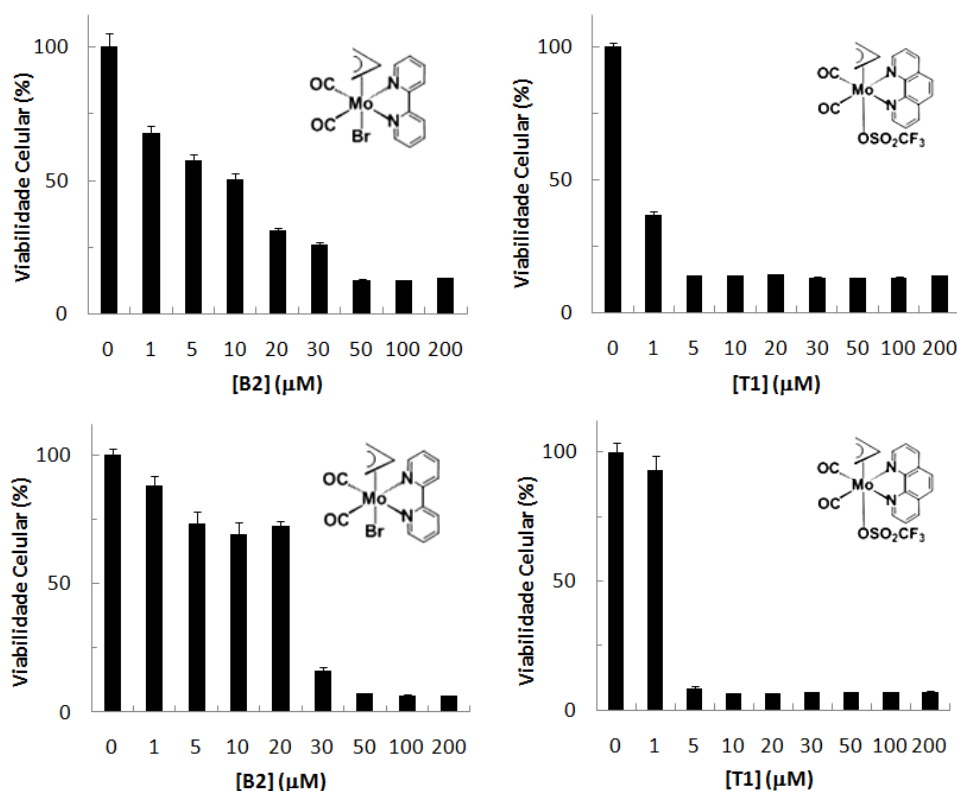


Figura 30 – Gráficos de viabilidade celular em células MCF-7 e RPE para estudos citotóxicos efectuados com diferentes compostos.

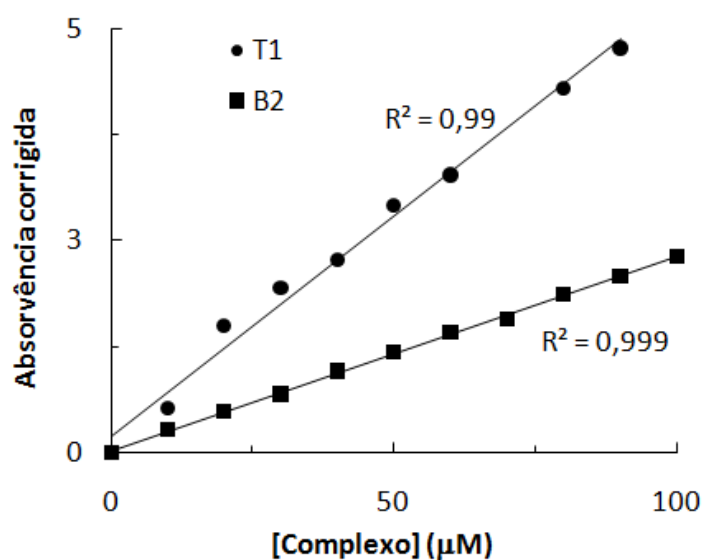


Figura 31 – Gráfico representativo da variação da absorvência no pico máximo de cada composto (271 nm para T1, 299 nm para B2) com a concentração do respectivo composto para determinação do respectivo coeficiente de extinção molar (declive da recta resultante).